



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

**Análise da atividade transcricional dos promotores dos genes
p6.9, ie-1, gp64, vp39, p10 e polh do *Anticarsia gemmatalis*
multiple nucleopolyhedrovirus (AgMNPV) e do promotor
CMVie1 de um herpesvirus**

FABRICIO DA SILVA MORGADO

Orientador: Dr. Bergmann Morais Ribeiro

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular, do Departamento de Biologia Celular, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Molecular.

Brasília, 2012

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Bergmann Morais Ribeiro (CEL-UNB)

Dra. Maria Elita de Castro Batista (Embrapa-Cenargen)

Prof. Dra. Andrea Queiroz Maranhao (CEL-UNB)

Trabalho desenvolvido no Laboratório de
Microscopia Eletrônica e Virologia da
Universidade de Brasília, sob a orientação
do Prof. Dr. Bergmann Morais Ribeiro

AGRADECIMENTOS

A minha querida mãe Zilda, pelo imenso amor que me tornou o que sou, por ser uma praia segura em meio a águas de difícil navegação, pelo exemplo de bondade, carinho, humildade, honestidade, honra e gentileza.

Ao meu grande pai Durval, cujo constante apoio me deu a segurança para avançar em direção aos meus objetivos, pelo exemplo de generosidade infinita e compaixão aberta a todos, perseverança, criatividade e coragem.

Ao meu irmão Leandro e minha irmã Juliana, pois juntos crescemos e nos tornamos adultos, bebemos da mesma fonte e agora cada um pode seguir seu caminho, mas sempre estaremos conectados pelos tempos de infância.

Eterno amor a esta família!

Um imenso carinho aos meus grandes amigos e amigas de longa data.

A todos os colegas de laboratório: Daniel, Anabele, Roberto, Clara, Fernando, Léo, Lorena, Fábria, Mariana, Briana, Miguel, Dani, Kênia, Greice, Bruna, Breno, Gláucia, Athos, Virgínia, Rosana, André Bertrand, Karol, Raíssa, Câmara, Cícero e tantos outros que cruzaram pelo laboratório e tornaram este o melhor lugar para trabalhar no mundo.

Ao professor José Raimundo e em especial, suas alunas Bruna e Rafaela, pela ajuda com as células de mamíferos. Aos companheiros do controle biológico da Embrapa/Cenargen, em especial a dra. Maria Elita pela disponibilidade de larvas e células de inseto e pela inspiração em seus trabalhos com os baculovírus. Aos professores Renato Resende e Tatsuya Nagata, pela disponibilidade e motivação na produção acadêmica. Ao Francisco Pinedo e Susane Neves pelas pesquisas iniciais neste tema, materiais e inspiração.

Ao meu orientador prof. Bergmann, pelas oportunidades e confiança cedidas ao longo de minha graduação e mestrado, que sempre me servirão de constante inspiração ao crescimento intelectual, pelo exemplo de dedicação ao esforço acadêmico e pela paciência quando a vida interfere nos experimentos.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS, TABELAS E GRÁFICOS.....	v
LISTA DE ABREVIACÕES	vii
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Caracterização do baculovírus <i>Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus</i> (AgMNPV).....	1
1.2. O ciclo de infecção celular	8
1.3. As interações entre baculovírus e hospedeiro.....	13
1.4. O estudo da atividade dos promotores virais	16
1.5. Informações sobre as proteínas e seus promotores	20
1.5.1. CMVie1.....	20
1.5.2. IE1.....	20
1.5.3. GP64	21
1.5.4. VP39.....	22
1.5.5. P6.9	23
1.5.6. P10	24
1.5.7. POLH.....	25
1.5.8. HEL.....	28
2. OBJETIVOS	28
2.1 Justificativa.....	28
2.2 Objetivos gerais	28
2.3 Objetivos específicos	29
3. MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1. Vírus.....	29
3.2. Células.....	30
3.3. Isolamento dos promotores virais por PCR e clonagem no vetor de transferência p2100FLUC	30
3.4. Construção dos vírus recombinantes por recombinação homóloga em células de inseto....	37
3.5. Isolamento dos vírus recombinantes por diluição seriada	39
3.6. Amplificação, isolamento do DNA viral e titulação dos inóculos virais recombinantes	40
3.7. Ensaio de detecção da atividade de luciferase em células de inseto infectadas com AgMNPV recombinantes	41
3.7.1. Ensaio de medição por lise	42

3.7.2. Ensaio de medição contínua	43
3.8. Ensaio de infecção de lagartas <i>Anticarsia gemmatalis</i> e <i>Spodoptera frugiperda</i>	44
3.8.1. Determinação da luminescência derivada da infecção da hemolinfa de larvas de lepidópteros	44
3.8.2. Visualização e fotodocumentação de larvas <i>Anticarsia gemmatalis</i> infectadas por injeção intrahemocélica.....	46
3.9. Análise in silico das sequências dos promotores.....	47
4. RESULTADOS	49
4.1. Amplificação dos promotores virais e clonagem no vetor de transferência p2100FLUC....	49
4.2. Geração e purificação dos baculovírus AgMNPV recombinantes	54
4.3. Detecção da atividade de luciferase em células de inseto infectadas com os AgMNPV recombinantes	56
4.3.1. Ensaio de medição por lise	56
4.3.2. Ensaio de medição contínua	57
4.4. Detecção da atividade de luciferase em larvas de inseto infectadas com os AgMNPV recombinantes	64
4.4.1. Ensaio de infecção por injeção intrahemocélica	64
4.5. Ensaio de detecção da atividade de luciferase em células de mamífero transduzidas.....	69
4.6. Análise da sequência dos promotores utilizados neste trabalho	70
4.6.1. Promotor CMV.....	70
4.6.2. Promotor IE1	73
4.6.3. Promotor GP64.....	75
4.6.4. Promotor VP39.....	78
4.6.5. Promotor P6.9.....	80
4.6.6. Promotor P10.....	81
4.6.7. Promotor POLH.....	82
4.6.8. Promotor HEL.....	84
5. DISCUSSÃO E PERSPECTIVAS	87
5.1. Luciferase como gene repórter para análise de promotores durante a infecção de baculovírus	87
5.2. A infecção de células de inseto cultivadas in vitro.....	88
5.3. A infecção de larvas <i>Anticarsia gemmatalis</i> e <i>Spodoptera frugiperda</i>	98
5.4. O baculovírus AgMNPV é capaz de transduzir células derivadas de mamíferos.....	101
6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	104
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	107

ÍNDICE DE FIGURAS, TABELAS E GRÁFICOS

Figura 1: As progênies infectivas dos baculovírus.	2
Figura 2: Relação filogenética dos quatro gêneros atuais em que se divide a família <i>Baculoviridae</i>	7
Figura 3: Sequências do promotor precoce ie1 e do promotor muito tardio polh	13
Figura 4: Estratégia de clonagem dos insertos promotor gp64 ou ie1 a montante do gene luciferase de vaga-lume.....	32
Figura 5: Estratégia de clonagem dos promotores vp39, p6.9, hel, polh, p10 e CMVie1 no plasmídeo de transferência p2100IE1FLUC	37
Figura 6: Mapa vetor dos plasmídeos de transferência por recombinação homóloga construídos p2100GP64FLUC e p2100IE1FLUC	49
Figura 7: Gel de agarose 0,8% contendo digestões dos plasmídeos p2100, p2100GP64FLUC e p2100IE1FLUC com as enzimas <i>EcoRV</i> e <i>SspI</i>	50
Figura 8: Gel de agarose 0,8% contendo o resultado das reações de PCR que isolaram os promotores virais p6.9, CMVie1, hel, p10, polh e vp39.	50
Figura 9: Géis de agarose (0,8%) contendo as digestões dos plasmídeos p2100CMVFLUC, p2100POLHFLUC e p2100VP39FLUC.....	52
Figura 10: Géis de agarose (0,8%) contendo as digestões dos plasmídeos p2100P10FLUC, p2100HELFLUC e p2100P69FLUC.....	53
Figura 11: Esquema da recombinação entre o <i>locus</i> polh do baculovírus recombinante oclusão negativa vAgGAL	54
Figura 12: Gel de agarose 0,8% contendo o resultado de reações de PCR utilizando <i>primers</i> de cada promotor e um <i>primer</i> que anela no gene FLUC	55
Figura 13: Fotografias em campo escuro e campo claro de larvas <i>Anticarsia gemmatalis</i> infectadas por via intrahemocélica com os baculovírus vAgIE1FLUC, vAgGP64FLUC, vAgVP39FLUC, vAgP69FLUC, vAgPOLHFLUC e vAgP10FLUC.....	66
Figura 14: Fotografias em campo escuro e claro de pupa de <i>Anticarsia gemmatalis</i> infectada com o baculovírus vAgVP39FLUC.	67
Figura 15: Sequência do promotor CMVie1 (781 pb), isolado do plasmídeo pRLCMV (Promega)	73
Figura 16: Alinhamento dos resultados da pesquisa BlastN utilizando a sequência do promotor ie1 ...	75
Figura 17: Alinhamento dos resultados da pesquisa BlastN utilizando a sequência do promotor gp64	78
Figura 18: Alinhamento dos resultados da pesquisa BlastN utilizando a sequência do promotor vp39	79
Figura 19: Alinhamento dos resultados da pesquisa BlastN utilizando a sequência do promotor p6.9.	81
Figura 20: Alinhamento dos resultados da pesquisa BlastN utilizando a sequência do promotor p10..	82
Figura 21: Alinhamento dos resultados da pesquisa BlastN utilizando a sequência do promotor polh.	84
Figura 22: Alinhamento dos resultados da pesquisa BlastN utilizando a sequência do promotor hel...	86
Tabela 1: Lista dos oligonucleotídeos utilizados neste trabalho.	34
Tabela 2: Resumo dos resultados de medição contínua de luciferase	64
Tabela 3: Tabela resumo contendo informações dos elementos contidos (+) ou não (-) em cada promotor.....	98
Gráfico 1: Histogramas contendo os resultados dos ensaios de medição por lise das infecções dos vAgMNPV recombinantes.....	57
Gráfico 2: Séries temporais derivadas dos ensaios de medição contínua da infecção dos baculovírus recombinantes nas linhagens permissivas UFL-AG-286, TN5b e IPLB-Sf21-AE.....	61

Gráfico 3: Séries temporais derivadas dos ensaios de medição contínua da infecção dos baculovírus recombinantes nas linhagens não permissivas IPLB-LD652Y e C636.	62
Gráfico 4: Histograma contendo os resultados dos ensaios de medição de hemolinfa de larvas <i>Anticarsia gemmatalis</i> infectadas por via intrahemocélica com os baculovírus recombinantes. .	65
Gráfico 5: Histograma contendo os resultados de medição da hemolinfa de larvas <i>Spodoptera frugiperda</i> infectadas com os baculovírus recombinantes.....	69
Gráfico 6: Histograma contendo os resultados de medição por lise de células de mamíferos DUP145 e MCF7 transduzidas com o baculovírus recombinante vAgCMVFLUC.....	70

LISTA DE ABREVIACÕES

BV	<i>budded virus</i> , vírus extracelular envelopado
OB	<i>occlusion body</i> , corpo de oclusão
ODV	<i>occlusion derived virus</i> , vírus derivado de oclusão
AgMNPV	<i>Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus</i>
AcMNPV	<i>Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus</i>
FLUC	enzima Luciferase do vaga-lume <i>Photinus pyralis</i>
<i>et al.</i>	e colaboradores
h p.i.	horas após infecção
h p.t.	horas após transdução
CMV	citomegalovírus humano
CMVie1	promotor do gene <i>ie1</i> do herpesvírus CMV
TCID50	dose que infecta 50% da cultura de células
pfu	unidade formadora de placa
MOI	multiplicidade de infecção
DAR	região de ativação a montante do início da transcrição
UAR	região de ativação a montante do início da transcrição
TATA	região de início de montagem do complexo transcricional
INR	região de iniciação da transcrição
PCR	reação de polimerização em cadeia
dNTP	deoxinucleotídeo trifosfatado
rpm	rotações por minuto
pkb	pares de kilobases
pb	pares de bases
RLU	<i>relative light units</i> , unidades luminosas relativas

Ao longo deste trabalho:

Genes: *ie1, gp64, vp39, p6.9, polh e p10*

Proteínas: **IE1, GP64, VP39, P6.9, POLH e P10**

Promotores: **ie1, gp64, vp39, p6.9, polh e p10**

RESUMO

O baculovírus *Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus* (AgMNPV) é um dos melhores exemplos do uso de um vírus para controlar a população de um inseto-praga. Este baculovírus infecta larvas da mariposa *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera), uma praga do cultivo de soja, e tem sido utilizado como agente de controle biológico no Brasil por mais de duas décadas. Isto depende da habilidade deste vírus gerar dois fenótipos virais, um responsável pela sobrevivência no ambiente fora do hospedeiro, o corpo de oclusão (OB), que é usado como bioinseticida, o outro fenótipo é responsável pela infecção sistêmica, o *budded virus* (BV), que é uma partícula viral envelopada por membrana da célula hospedeira. Estes dois fenótipos ocorrem em momentos distintos da infecção celular, os BVs na fase tardia e os OBs na fase muito tardia. A regulação temporal e quantitativa da expressão gênica em baculovírus é baseada em transcrição, isto é, a expressão dos genes virais é determinada pela sequência dos promotores que regulam os genes. Neste trabalho, foram isolados os promotores dos genes *ie1*, *gp64*, *vp39*, *p6.9*, *polh*, *p10* e *hel*, do baculovírus AgMNPV, e o promotor CMV_{ie1} do Herpesvírus humano CMV, estas sequências reguladoras foram clonadas a montante do gene luciferase de vaga-lume e, a partir disto, baculovírus AgMNPV recombinantes foram construídos por recombinação homóloga. Isto permitiu avaliar a atividade de cada promotor durante a infecção de células de inseto permissivas e não-permissivas, além de quantificar a atividade dos promotores durante a infecção de larvas *Anticarsia gemmatalis* e *Spodoptera frugiperda*. Os promotores *vp39*, *p6.9* e *polh* foram os mais produtivos nos ensaios de expressão em células de inseto e lagartas. Também foi possível confirmar que o AgMNPV é capaz de transduzir células de mamíferos cultivadas *in vitro*. Este trabalho serve como uma demonstração do uso do baculovírus AgMNPV como vetor de expressão de proteínas heterólogas.

ABSTRACT

The *Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus* (AgMNPV) is one of the best examples of the use of a virus to control an insect pest in agriculture worldwide. This baculovirus infects larvae of *Anticarsia gemmatalis* moth (Lepidoptera), a soy bean pest, and has been used as a successful biocontrol agent in Brazil for over two decades. This depends on the unique ability to generate two viral phenotypes, one responsible for the viral survival in the environment outside the host and the agent of primary infection, which consists of viral particles encapsulated into a polyhedral shaped protein crystal, the occlusion body (OB), which is used as a bioinsecticide, and a second phenotype, the budded virus (BV), which is a single membrane-containing viral particle. The temporal and quantitative regulation of gene expression in baculoviruses is transcription based, that is, the expression is determined by the sequence of the gene regulating promoters. In this work, the promoters of the AgMNPV *ie1*, *gp64*, *vp39*, *p6.9*, *polh*, *p10* and *hel* genes and the Herpesvirus CMVie1 promoter, have been isolated and cloned upstream of the firefly luciferase gene, and recombinant AgMNPV baculoviruses were constructed by homologous recombination. The activity of each promoter was analysed during permissible and non-permissible insect cell infections, and during the infection of the *Anticarsia gemmatalis* and *Spodoptera frugiperda* larvae. The *vp39*, *p6.9* and *polh* promoters were the most efficient in the protein expression assays conducted in insect cells and larvae. It was also possible to confirm that the AgMNPV baculovirus is capable of transducing mammalian cells grown *in vitro*. This work is a demonstration of the biotechnological potential of the AgMNPV baculovirus as a vector for the expression of heterologous proteins.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Caracterização do baculovírus *Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus* (AgMNPV)

Os baculovírus são um grupo de vírus de artrópodes, principalmente das ordens Lepidoptera, Himenoptera e Diptera (Jehle *et al.*, 2006), que possuem uma característica única entre os vírus, a capacidade de produzir dois fenótipos virais, morfológica e temporalmente distintos: o primeiro fenótipo é denominado de *budded virus* (BV), que é produzido em uma fase inicial da infecção e atravessa a membrana plasmática carregando parte desta última, a segunda chama-se *occlusion derived virus* (ODV), que se encontra envolto por uma oclusão cristalina de origem protéica, denominada de corpo de oclusão ou *occlusion body* (OB). Os OBs são os agentes infectivos primários, garantem a sobrevivência das partículas virais em seu interior contra os rigores do meio ambiente, como luz UV e umidade, até que uma nova lagarta se alimente dos poliedros, iniciando uma nova infecção. Desta forma, a infecção primária ocorre pela ingestão de OBs por via oral, enquanto os BVs são os agentes de infecção secundária, permitindo a proliferação da infecção viral dentro do hospedeiro (Slack & Arif, 2007).

Os baculovírus são vírus com partícula viral no formato de bastão, envelopados, com DNA dupla fita, circular e de tamanho em média de 130 kpb (kilo pares de bases) (Rohrmann, 2011). O *Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus* (AgMNPV) isolado 2D (Zanotto *et al.*, 1992) pertence ao Grupo I dos NPVs, genoma composto por 132,239 pb (pares de bases) de DNA dupla fita, e é patogênico à lagarta da soja *Anticarsia gemmatalis* (Hubner), uma praga da agricultura da soja (*Glycine max*) (Moscardi *et al.*, 1999). Os OBs do baculovírus AgMNPV vêm sendo utilizados por mais de 20 anos no Brasil como bioinseticida para controlar a população da lagarta *Anticarsia gemmatalis*, produzido artesanalmente ou por formulações comerciais,

formando uma importante alternativa ao uso de inseticidas químicos, diminuindo assim os danos ambientais e sociais, além de reduzir custos de produção (Moscardi *et al.*, 1999; Rodas *et al.*, 2005).

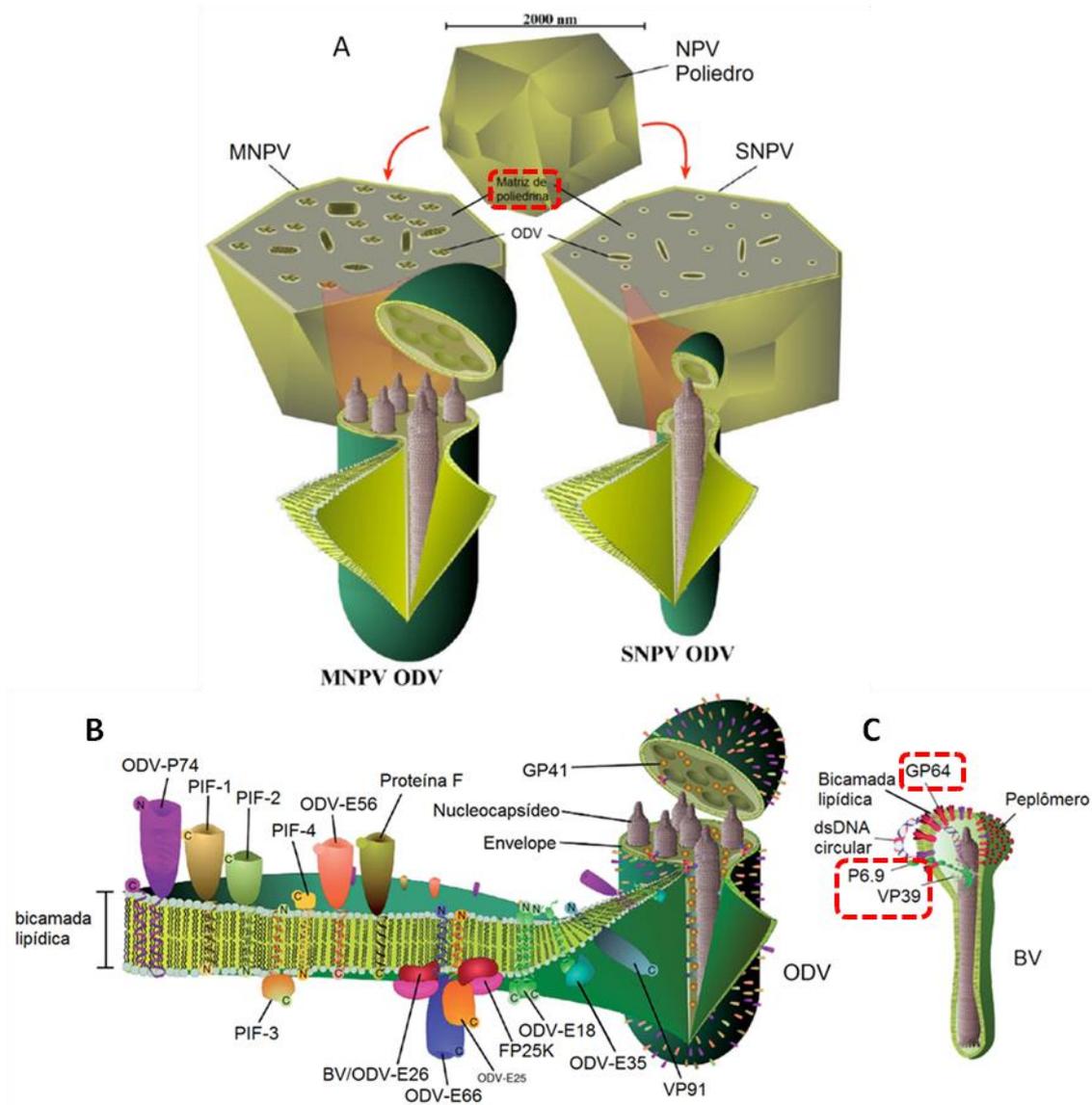


Figura 1: As progênes infectivas dos baculovírus. Representação de OBs produzidos por Nucleopolyhedrovirus (NPVs). Os ODVs, oclusos em uma matriz cristalina de poliedrina, podem conter um (SNPV) ou vários (MNPV) nucleocapsídeos por envelope (A). Representação do ODV com realce sobre as proteínas contidas na membrana deste vírion (B). Representação de BV e proteínas contidas na membrana (C). As proteínas estruturais cujos promotores foram avaliados neste trabalho estão realçadas em vermelho. Imagem adaptada de Slack & Arif, 2007

Em laboratórios de pesquisa, o baculovírus AgMNPV é facilmente manipulado e amplificado devido ao cultivo *in vitro* de linhagens celulares derivadas de inseto e imortalizadas que são capazes de propagar este vírus. A linhagem celular derivada de larvas *Anticarsia gemmatilis*, denominada UFL-AG-286 ou comumente UFLAG

(Sieburth & Maruniak, 1988), produz altos títulos de BVs após 12 h de infecção com o vírus AgMNPV (Castro *et al.*, 1997). A infecção causa mudanças estruturais nestas células nas primeiras 24 h, identificados como efeitos citopáticos e observados por microscopia de luz, como o arredondamento da célula, hipertrofia do núcleo e perda de extensões citoplasmáticas, além da evidente aparição dos corpos de oclusão no núcleo após 48 h p.i. (Pombo *et al.*, 1998). O meio de cultura retém os BVs infectivos e este meio é utilizado como inóculo viral para infecções *in vitro* posteriores.

Outras linhagens também são infectadas pelo baculovírus AgMNPV, como a linhagem derivada de larvas *Trichoplusia ni* BTI-Tn5B1-4, cuja produtividade da infecção é similar a infecção de células UFL-AG-286, em nível de tradução de proteínas, replicação de DNA viral e produção de BVs e OBs infectivos (Castro & Ribeiro, 2001). A linhagem de células derivadas de larvas da espécie *Spodoptera frugiperda* denominadas de IPLB-SF21-AE, também é suscetível a infecção por AgMNPV, com reduzida produção de DNA viral, e conseqüentemente BVs e OBs (Castro *et al.*, 1997).

Existem linhagens não permissivas à infecção do vírus AgMNPV, por definição, são linhagens em que a infecção viral não replica DNA e não gera progênie infectiva (Morris & Miller, 1994). Usualmente os efeitos citopáticos iniciais conflagram a morte celular programada ou apoptose, como ocorre na linhagem BM5 derivada de *Bombyx mori*, o bicho da seda. Outras linhagens podem ser suscetíveis à entrada e infecção inicial, mas resultam em baixa progênie viral e nenhuma produção de corpos de oclusão. Isto ocorre com a linhagem IPRI-CF-124T, derivada de larvas da espécie *Choristoneura fumiferana*, que aparentemente bloqueia a o progresso da infecção de AgMNPV (Castro *et al.*, 1997). Os mecanismos moleculares de bloqueio ou

suscetibilidade da infecção de baculovírus pela célula hospedeira são variados e em grande parte desconhecidos.

A infecção da larva *Anticarsia gemmatalis* por AgMNPV já foi bem estudada (Soares & Ribeiro, 2005), assim como a infecção do baculovírus tipo AcMNPV sobre a larva *Trichoplusia ni* (Passarelli, 2011). No campo, a infecção primária ocorre pela ingestão de OBs dispersos no ambiente, como em cima de folhas de soja. A matriz protéica que forma os corpos de oclusão dissolve quando exposta a uma solução alcalina e redutiva, o que ocorre no intestino médio da larva (Rohrmann, 2011). Isto resulta na liberação dos vírions contidos no OB. Estes vírus derivados de oclusão, ou ODVs, são envelopados e possuem proteínas associadas à membrana que realizam funções essenciais, como a dissolução da lâmina basal, que consiste de uma camada extracelular secretada pelas células epiteliais da mucosa do intestino da larva. Os ODVs devem ser capazes de adsorver na membrana das células epiteliais e entrar nas células, possivelmente por fusão das membranas auxiliada por proteínas virais do envelope. É essencial que ocorra a rápida infecção e produção de progênie viral na forma de BVs nestas células epiteliais do intestino, que estão sujeitas a descamação e descarte para o lúmen do intestino (Passarelli, 2011).

Após atravessar o intestino, evento que na infecção de AgMNPV sobre larvas *Anticarsia gemmatalis* ocorre a partir de 6 h (Soares & Ribeiro, 2005) e a infecção de AcMNPV sobre larvas *Trichoplusia ni* após 12 h após ingestão dos OBs infectivos (Passarelli, 2011), a infecção por baculovírus deve se espalhar pelo hospedeiro, utilizando células que envolvem as traquéias e posteriormente os hemócitos contidos na hemolinfa das larvas, estes últimos estão em circulação livre pela hemolinfa, e portanto servem como perfeitos proliferadores da infecção sistêmica baculoviral (Soares & Ribeiro, 2005). Após 5 dias de infecção, a larva apresenta letargia e paralisia. Análise de

tecidos por microscopia de luz indica grande acúmulo de poliedros em tecidos específicos, como nas células de gordura, hemócitos e células traqueolares. Em contraposição, alguns tecidos da larva não produzem OBs, mesmo infectados, como as células do intestino e dos túbulos de Malpighi (Soares & Ribeiro, 2005; Passarelli, 2011; Rohrmann, 2011).

Com o isolamento do AgMNPV-2D, que é a linhagem do vírus mais comum nas populações de *Anticarsia gemmatalis* encontradas no campo em 1978 (Zanotto *et al.*, 1992), estirpe viral mais utilizada na maioria dos laboratórios desde então, além de sucessivas aplicações deste vírus no campo ao longo de 30 anos (Moscardi *et al.*, 1999), tornam o baculovírus AgMNPV uma fonte rica de informações sobre genética de populações de vírus na natureza (Oliveira *et al.*, 2006) e o desenvolvimento da resistência de larvas *Anticarsia gemmatalis* contra o AgMNPV (Abot *et al.*, 1996; Fuxa & Richter, 1998). Um marco importante na história do conhecimento deste vírus foi o sequenciamento completo do genoma AgMNPV-2D (Oliveira *et al.*, 2006), que permitiu integrar diversos estudos moleculares independentes sobre genes e fragmentos do genoma até então sequenciados, elucidar eventos evolutivos como transversões, variações na sequência genômica em relação aos demais baculovírus, proteínas únicas ao AgMNPV e construir uma filogenia mais acurada.

O sequenciamento também confirmou que o baculovírus AgMNPV não possui dois genes, *cathepsin* e *chitinase*, presentes no genoma de todos *Alphabaculovirus* (Slack, Ribeiro & de Souza, 2004). Estas duas proteínas estão relacionadas com a liquefação do corpo das larvas infectadas pelos demais baculovírus, esta liquefação iria auxiliar na dispersão dos OBs (Rohrmann, 2011). A ausência destas proteínas durante a infecção das larvas *Anticarsia gemmatalis*, impede o rompimento da cutícula exterior composta de quitina, após a morte da larva. Esta característica única do AgMNPV é

muito desejada em seu uso no laboratório como vetor de expressão de proteínas de interesse, se considerarmos que a protease V-CATH pode degradar a proteína recombinante e reduzir a produtividade da expressão (Jarvis, Weinkauff & Guarino, 1996).

O baculovírus filogeneticamente mais próximo ao AgMNPV é o *Choristoneura fumiferana defective nucleopolyhedrovirus* (CfDEFNPV), que existe em relação simbiótica com outro baculovírus *Choristoneura fumiferana multiple nucleopolyhedrovirus* (CfMNPV), dentro da larva hospedeira *Choristoneura fumiferana*, uma peste de florestas de clima temperado, como do Canadá (Lauzon *et al.*, 2005). A similaridade a nível de identidade dos aminoácidos das proteínas codificadas por ambos vírus é muito alta, acima de 92%, se considerarmos as proteínas estruturais do BV e dos corpos de oclusão (Oliveira *et al.*, 2006).

Considerando o alinhamento de 29 genes comuns entre os baculovírus sequenciados, proposto por Jehle *et al.* (2006), a filogenia dos baculovírus está organizada em 4 grupos, que constituíram os atuais gêneros da família *Baculoviridae*:

- ***Alphabaculovirus***: inclui os baculovírus específicos a hospedeiros da ordem Lepidoptera, podendo ser MNPV ou SNPV. Este gênero se subdivide em dois tipos, os *Alphabaculovirus* do Grupo I, que inclui a espécie tipo AcMNPV e o baculovírus AgMNPV, estes utilizam a proteína GP64 como principal glicoproteína de envelope do BV; os *Alphabaculovirus* do Grupo II, que inclui o baculovírus *Lymantria dispar* MNPV, utilizam a proteína F como principal glicoproteína do envelope do BV. Produzem BV e ODV como fenótipos infectivos. A proteína formadora do corpo de oclusão (poliedros) é a poliedrina (POLH).
- ***Betabaculovirus***: incluem os granulovírus específicos a hospedeiros da ordem Lepidoptera, produzem BV e ODV, sendo que a proteína que forma o corpo de

ocusão chama-se granulina. A espécie tipo deste gênero é o *Cydia pomonella* GV (CpGV).

- ***Gammabaculovirus***: incluem os NPVs encontrados em hospedeiros da ordem Hymenoptera (vespas). Produzem OBs com apenas uma partícula viral ODV. A espécie tipo é o *Neodiprion lecontei* NPV (NeleNPV).
- ***Deltabaculovirus***: deve incluir os baculovírus específicos à ordem Diptera (mosquitos), a espécie tipo é *Culex nigripalpus* NPV (CuniNPV). Produz OBs cuja proteína principal não é homóloga a granulina ou poliedrina dos demais gêneros.

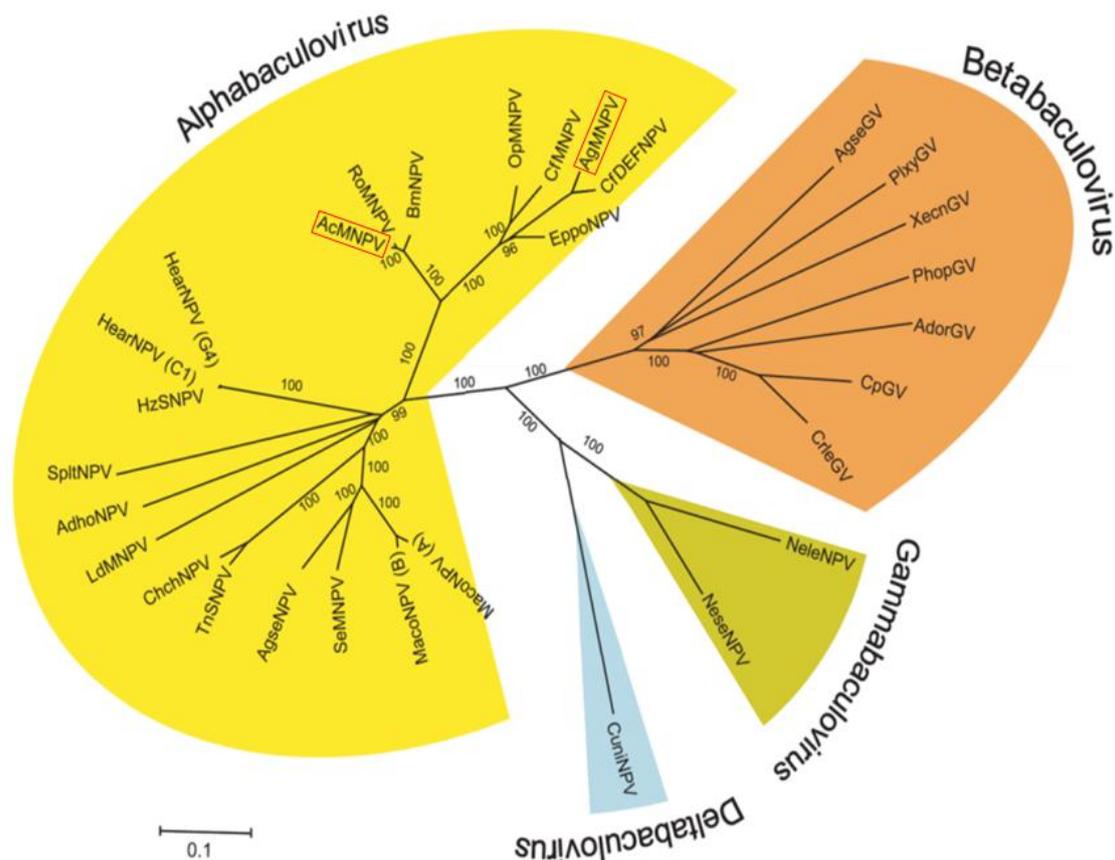


Figura 2: Relação filogenética dos quatro gêneros atuais em que se divide a família *Baculoviridae*. Árvore mostrando a relação de proximidade filogenética com base em sequências gênicas ou aminoácidas e conseqüente agrupamento nos quatro gêneros atualmente aceitos. Estão sendo destacados em caixa vermelha os *Alphabaculovirus* AcMNPV e AgMNPV, que ocupam os dois clados distintos, formando o subgrupo *Alphabaculovirus* Grupo I. A árvore foi modificada de Jehle *et al.* (2006); na figura original não existe o vírus AgMNPV. Esta modificação foi feita com base em Oliveira *et al.* (2006)

1.2. O ciclo de infecção celular

A infecção de células de inseto por baculovírus se inicia com a adsorção de partículas infectivas (BV ou ODV) na superfície externa da membrana celular e a partir disto, a partícula viral é endocitada, no caso dos BVs (Volkman *et al.*, 1985) ou fusionada com a membrana, no caso dos ODVs (Horton *et al.*, 1993). Após a endocitose dos BVs e dentro da vesícula resultante, conforme diminui o pH, inicia a fusão de membranas do envelope viral e membrana da vesícula, esta ação é mediada pela proteína GP64, no caso dos *Alphabaculovirus* do Grupo I (Blissard & Rohrmann, 1992). O capsídeo viral é liberado da vesícula e envelope, no citoplasma da célula é carregado para o núcleo por meio de proteínas motoras via filamento de actina do hospedeiro (Ohkawa *et al.*, 2010). Uma vez no núcleo, fatores de transcrição do hospedeiro irão se associar ao DNA dupla fita circular, especificamente nos motivos de transcrição genéricos como TATA box (sequência TATAA) e o motivo conservado de iniciação da transcrição precoce (*early*) CAGT (Pullen & Friesen, 1995). Com a associação dos fatores de transcrição ao DNA viral, a RNA polimerase II do hospedeiro inicia a transcrição dos genes da fase precoce. Muitos destes genes precoces são transativadores transcripcionais, em especial o gene *immediate early 1* ou *ie1*, isto é, formam proteínas que irão servir de fatores de transcrição para o genoma viral, assim aumentando a transcrição dos genes virais da fase precoce (Hoopes & Rohrmann, 1991), além de iniciar a montagem do estroma virogênico (Nagamine *et al.*, 2005), marcando o início do controle da célula pelo vírus.

Com a expressão da DNA polimerase baculoviral e transporte desta para o núcleo, inicia-se a replicação do DNA viral e marca-se o momento de início da fase tardia ou tardia da infecção celular, evento que ocorre a partir das 6 h após a infecção celular em cultura de células de inseto (Miller, 1997). Simultaneamente, nota-se o

acúmulo de proteínas LEF (*late expression factor*), que servem tanto como transativadores a partir dos motivos de transcrição tardia, em especial o motivo conservado TAAG (Todd, Passareli & Miller, 1995; Todd *et al.*, 1996). Uma característica especial dos baculovírus é a presença de uma holoenzima RNA polimerase viral insensível à alpha-amanitina (um composto inibidor da RNA polimerase II), composta por 4 subunidades, as proteínas derivadas dos genes LEF-8, LEF-4, LEF-9 e p47 (Guarino *et al.*, 1998). Esta RNA polimerase viral tem forte afinidade pelo motivo de transcrição tardia TAAG e sequências proximais à este motivo, a especificidade e alta taxa de transcrição desta enzima garantem a intensa expressão de genes das fases tardia e de uma outra fase mais tardia, denominada de fase muito tardia ou muito tardia (Guarino *et al.*, 1998).

Simultâneo a replicação viral, nota-se o aparecimento de diversas proteínas baculovirais que irão moldar a célula, alterando sua morfologia, como o citoesqueleto celular (Pombo *et al.*, 1998), evitando a apoptose (Clem *et al.*, 2007), distribuição dos cromossomos no núcleo (Nagamine *et al.*, 2006), acúmulo de proteínas virais tanto na membrana celular, como a proteína da fusão de membrana GP64, e no núcleo, como a proteína formadora do capsídeo viral VP39, que se associa a proteínas com afinidade ao DNA viral (Kawasaki *et al.*, 2004), permitindo a concentração do DNA viral no núcleo e posterior formação do estroma virogênico, que se tornará a região nuclear onde ocorre a replicação do DNA viral e montagem dos capsídeos derivando a progênie viral (Pombo *et al.*, 1998, Rohrmann, 2011). Estas partículas virais uma vez montadas são exportadas para o citoplasma, quando atingem a membrana citoplasmática, interagem com as proteínas virais associados a esta e são então “brotados” para o exterior da célula, restando uma parte da membrana citoplasmática, que forma o envelope viral dos BVs (Slack & Arif, 2007).

Em momentos posteriores, o tráfego de capsídeos montados para fora do núcleo é pausado e inicia-se a montagem dos OBs, dentro do núcleo (Pombo *et al.*, 1998). Como os poliedros são cristais altamente densos, de natureza protéica, cuja composição principal da matriz cristalina é a proteína poliedrina (POLH), estima-se que pelo menos 40% de todas proteínas expressas pela célula em momentos muito tardios da infecção seja composto pela proteína POLH (Ramachandran *et al.*, 2001). Isto reflete a capacidade de hiperexpressão de genes virais muito tardios a partir do genoma baculoviral.

A regulação deste processo de formação das duas partículas infectivas em momentos distintos, primeiro BV na fase tardia e depois OB na fase muito tardia, é um processo complexo que envolve a expressão sequencial e coordenada de genes (Jiang, 2006). O *timing* e o nível de expressão relativa a partir do DNA viral são controlados, em grande parte, ao nível transcricional (Todd *et al.*, 1996). Deve-se notar que as proteínas contidas no capsídeo e associadas ao DNA viral não possuem funções conhecidas que as caracterizariam como fatores de transcrição ou potencializadores transcricionais em *trans* (Rohrmann, 2011), o que implica em uma necessária utilização inicial da RNA polimerase II do hospedeiro para transcrever os genes da fase precoce, eventualmente formando a partir destes transcritos a holoenzima RNA polimerase viral (Guarino *et al.*, 1998), que irá transcrever os genes das fases tardia e muito tardia.

Evidências da necessidade da RNA polimerase e fatores de transcrição do hospedeiro na fase precoce da infecção incluem a sensibilidade ao composto bloqueador de RNA polimerase II α -amanitina, presença de motivos eucarióticos conservados de transcrição nas sequências dos promotores da fase precoce e a transcrição a partir de promotores da fase precoce em células não infectadas (Kogan, Chen & Blissard, 1995; Hoopes & Rohrmann, 1991).

Em momentos avançados da infecção, inicia-se a hiperexpressão de genes muito tardia ou muito tardios, em especial observa-se o acúmulo da proteína poliedrina (POLH), que é o componente principal dos corpos de oclusão (Coullibaly *et al.*, 2009; Ji *et al.*, 2010), e por microscopia de luz observa-se a formação e acúmulo dos poliedros no núcleo das células infectadas após 48 h p.i. (Pombo *et al.*, 1998). A hiperexpressão só é possível se o vírus estiver expressado seus genes da fase precoce e o hospedeiro deve possuir fatores de transcrição adequados, muitos destes são transativadores e/ou fatores de transcrição dos genes da fase posterior, portanto é essencial existir um nível mínimo de proteínas reguladoras durante o início da infecção para garantir a hiperexpressão da fase muito tardia (Ghosh *et al.*, 1998; Morris & Miller, 1992). Outra exigência é o desligamento da transcrição normal a partir do genoma do hospedeiro ou silenciamento de parte da transcrição a partir do genoma do hospedeiro, para alocar os fatores de transcrição para o estroma virogênico e garantir a presença dos recursos como aminoácidos e nucleotídeos para uso na expressão e replicação do vírus (Nagamine *et al.*, 2006). Por fim, a replicação do DNA viral também é um pré-requisito para a expressão de genes na fase tardia e a hiperexpressão na fase muito tardia, conforme evidenciado ao bloquear a replicação do DNA viral com o inibidor afidicolina, o que resulta em reduções drásticas na expressão de genes da fase tardia e muito tardia (Glocker *et al.*, 1993).

Outros pontos de interesse em termos de regulação gênica são os *enhancers* de transcrição, no caso dos baculovírus, regiões homólogas (HR) espalhadas pelo genoma viral possuem efeitos *enhancers* em *cis*, especialmente quando presentes *upstream* a promotores virais. Outra consideração é que os mRNAs transcritos a partir do DNA viral são poliadenilados e apresentam um *cap* de metil guanosina na extremidade 3', o que indica uma regulação pós-transcricional que ocorre durante a infecção (Rohrmann,

2011). Recentemente, observou-se que RNAs de interferência (RNAi) também possuem papéis de regulação gênica durante a infecção viral, apesar de serem menos evidentes e pouco estudados (Kim *et al.*, 2012). Finalmente, já foram observados RNAs não codificadores (ncRNA) *downstream* aos promotores fortes como o promotor do gene *polh*, com indícios preliminares que funcionam como RNAs reguladores da transcrição gênica (Katsuma *et al.*, 2011).

Em contraparte, devido a novas técnicas de detecção da atividade transcricional dos baculovírus, alguns pontos considerados como norma, como a expressão dos genes virais em cascata, podem não ser tão simples quanto pareciam (Oliveira, 2010). Estudos de transcriptoma demonstram que a divisão imediatamente precoce, precoce, tardia e muito tardia não são tão bem definidas e provavelmente não funcionam exatamente como cascata de expressão, tendo uma atividade mais similar a uma rede de expressão, isto é, as interações ao nível transcricional ocorrem em grupos de interação gênica (Oliveira, 2010). Estudos do transcriptoma total da fase tardia da infecção de AcMNPV em larvas *Bombyx mori* demonstram que praticamente todos motivos tardios TAAG são utilizados na transcrição tardia, independente da posição na fita *sense* ou *antisense* e independente da posição em relação às ORFs (Katsuma *et al.*, 2011).

Os elementos principais dos promotores precoces são: elementos TATA (25 a 31 nucleotídeos *upstream* da posição +1 do início do RNA), motivos de iniciação da transcrição (INR) em especial a sequência tetranucleotídica CAGT, regiões de elementos ativadores *downstream* (DAR) como a sequência CACNG e regiões de elementos ativadores distais *upstream* (UAR) como a sequência CACGTG. Entre estes, os elementos cruciais são o TATA box e INR, sendo que os promotores precoces podem ser classificados como contendo ambos elementos (TATA+, INR+), apenas INR (TATA-, INR+) ou apenas TATA box (Miller, 1997). Existem ainda, promotores

precoces “não convencionais”, como o promotor dos genes *dnapol* e *helicase*, que não contém nenhum destes elementos mas são ativados na fase precoce da infecção (Lu & Carstens, 1991). Estas informações sobre a sequência dos elementos DAR e UAR são referentes aos baculovírus mais estudados, como o *Autographa californica* MNPV (AcMNPV) e *Orgyia pseudotsugata* MNPV (OpMNPV).

O elemento principal dos promotores tardios é a sequência tetranucleotídica TAAG, que é o motivo de iniciação de transcritos desta fase (Thiem & Miller, 1990; Todd *et al.* 1996). Outros elementos a serem considerados são os elementos *burst* entre o INR TAAG e o códon de iniciação ATG dos promotores de genes muito tardia, como *polh*, estas sequências auxiliam a hiperexpressão de genes da fase muito tardia (Todd *et al.* 1996, Yang & Miller, 1999).

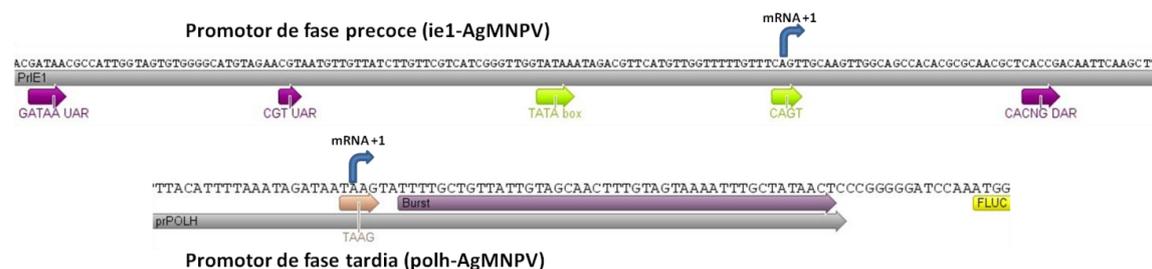


Figura 3: Sequências do promotor precoce *ie1* e do promotor muito tardio *polh*, com detalhamento dos elementos INR da fase precoce (CAGT) e da fase tardia (TAAG), com realce na posição de início de transcrição (mRNA +1). Alguns elementos DAR e UAR estão presentes no promotor *ie1*, assim como o elemento TATA box a -27 pb a montante do INR CAGT. No promotor *polh* o elemento de hiperexpressão na fase muito tardia, *burst*, está realçado.

1.3. As interações entre baculovírus e hospedeiro

Coevolução é definida como a evolução recíproca entre espécies que interagem, impulsionada pela seleção natural. Em interações que envolvem um patógeno e seu hospedeiro, a coevolução pode resultar em coespeciação, isto é, a formação de espécies de patógenos específicos aos hospedeiros com quem interagem, enquanto que os hospedeiros evoluem de forma a desenvolver mecanismos de defesa contra estes patógenos (Herniou *et al.*, 2004). A diversificação de espécies de baculovírus ocorre por

transmissão horizontal de uma espécie de baculovírus entre dois hospedeiros de ordens distintas, depois ocorre a co-especialização nas respectivas ordens.

Os baculovírus coevoluíram com seus hospedeiros de forma a se adaptar ao ciclo de vida deste último, a maior evidência disto são os corpos de oclusão, que são estruturas altamente especializadas presentes nos vírus da família *Baculoviridae* (Herniou *et al.*, 2004). Na natureza, as larvas de insetos da ordem Lepidoptera surgem em momentos específicos do ano, relacionados à época de crescimento vegetativo das plantas que a larva irá se alimentar. Entre estes períodos, durante o inverno ou outono, o inseto fica em dormência, seja em diapausa da larva ou pupa, seja na forma de ovos. Estes períodos em que as larvas dos hospedeiros não estão presentes no meio ambiente apresentaram uma pressão seletiva sobre os baculovírus, afinal, como estes garantiriam a sobrevivência de sua progênie durante a ausência do hospedeiro? O fenótipo OB é uma resposta aos momentos de latência no ciclo de vida do hospedeiro, os poliedros infectivos garantem a sobrevivência das partículas virais por muito tempo no meio ambiente, tempo suficiente até o surgimento de uma nova geração de larvas que irão se alimentar de material que contém os poliedros e assim garantir a transmissão horizontal do vírus ao longo de períodos estendidos (Herniou *et al.*, 2004).

O fenômeno de transmissão vertical já foi observado em AcMNPV infectando larvas de *Spodoptera frugiperda* em doses subletais, os indivíduos que sobrevivem seguem a metamorfose de larva a pupa e então indivíduo adulto, que quando se reproduz e realiza ovoposição, é possível detectar a presença de baculovírus nos ovos depositados pelos adultos infectados e progênie resultante (Miller, 1997). Neste caso, a infecção não é pronunciada, detecta-se muito pouca transcrição e proliferação do DNA viral, e existem indícios que o bloqueio ocorre devido à especificidade do baculovírus na infecção de células e tecidos da larva, ao invés de tecidos diferenciados no indivíduo

adulto (Zhang *et al.*, 2008). A transmissão vertical auxilia na dispersão do vírus, permitindo que siga a população em migração ou dispersão durante a fase adulta (Miller, 1997).

A coevolução de baculovírus e seus hospedeiros é ainda mais evidente ao considerarmos a infecção das larvas hospedeiras. Observa-se uma grande especificidade em termos de letalidade e infectividade, por exemplo, os poliedros de AcMNPV em baixas doses causam morte em larvas de *Trichoplusia ni*, enquanto que a letalidade destes OBs em larvas de *Anticarsia gemmatalis* é muito baixa, e isto está associado a uma baixa produção de partículas virais por células da hemolinfa e, por consequência, baixa proliferação sistêmica do vírus no organismo (Chikalaya *et al.*, 2009). Os BVs de AcMNPV causam infecção sistêmica quando injetados na hemolinfa da larvas de *Spodoptera frugiperda*, no entanto os OBs possuem baixa capacidade infectiva nesta espécie, devido a uma aparente dificuldade dos ODVs de infectarem as células do epitélio intestinal (Haas-Stapleton, Washburn & Volkman, 2005). A especificidade é uma questão multifatorial, que envolve a capacidade de infecção de células do intestino pelas partículas virais derivadas de oclusão, a capacidade de atravessar este tecido e infectar células da hemolinfa para proliferar a infecção sistêmica, a capacidade de replicar o DNA viral em grandes quantidades e a capacidade de expressar rápida e intensamente os genes virais garantindo o controle das células infectadas (Passareli, 2011).

A sequência de nucleotídeos dos promotores de genes baculovirais também fornecem evidências da coevolução entre hospedeiro e vírus, existem elementos de transcrição em promotores precoces baculovirais que são muito similares aos elementos de transcrição contidos no genoma dos hospedeiros (Miller, 1997). A presença e posição de elementos TATA box e o motivo de iniciação de transcrição da fase precoce

CAGT são muito similares aos encontrados em promotores de genes do hospedeiro. Por outro lado, o elemento INR para transcrição tardia (TAAG) não é comum tanto no genoma do baculovírus quanto no genoma de insetos, isto é uma estratégia importante para o vírus, pois o elemento TAAG selecionado nos promotores de ORFs da fase tardia vira um alvo exclusivo da RNA polimerase viral, o que permite a expressão diferenciada de certos genes virais na fase tardia da infecção (Jiang *et al.*, 2006)

1.4. O estudo da atividade dos promotores virais

Entre os anos 1980 e 2000, a maioria dos estudos voltados à biologia molecular básica dos baculovírus foram realizados. Praticamente todas as noções fundamentais, referentes à transcrição de genes de baculovírus discutidas neste trabalho foram definidas durante esta época. As técnicas utilizadas buscavam o isolamento e caracterização de genes com efeitos sobre a transcrição e replicação viral, como os genes *late expression factors (lef)*, gradualmente revelando algumas funções individuais e em conjunto dos genes estudados (Todd, Pasarelli & Miller, 1995; Pullen & Friesen, 1995). Isto ocorreu previamente a técnicas atuais de sequenciamento em larga escala, transcriptomas e PCR em tempo real, que são mais abrangentes e sensíveis, permitindo realçar a rede de interações entre os genes e a expressão dos mesmos. Estas últimas técnicas vieram a confirmar e rejeitar algumas hipóteses, além de levantar novas questões sobre as interações moleculares destes vírus (Katsuma *et al.*, 2012).

Uma das técnicas muito utilizadas foram os ensaios de transcrição *in vitro*, onde extratos citoplasmáticos de células infectadas ou não por baculovírus são misturados com plasmídeos contendo promotores virais regulando algum gene repórter (na época, o mais utilizado era o gene cloranfenicol acetil transferase ou CAT) (Glocker, Hooper & Rohrmann, 1992). Os fatores de transcrição contidos no extrato nuclear permitem a

expressão de genes a partir dos promotores virais contidos nos plasmídeos, o que permitiu a determinação de diversos fatores envolvidos na transcrição de genes virais (Todd *et al.*, 1996). O extrato de células não infectadas permite a determinação de quais promotores virais dependem da RNA polimerase II do hospedeiro, enquanto que o extrato de células infectadas transcrevem promotores de todas as fases da infecção viral.

Outra técnica muito utilizada foi a transfecção de plasmídeos contendo gene ou genes com atividade transativadora, junto a plasmídeos contendo promotores regulando genes repórteres (Todd *et al.*, 1996). Este ensaio de complementação permite identificar a atividade específica de um gene viral em relação aos promotores de diferentes fases da infecção, além de ser capaz de identificar genes com funções associadas à replicação de DNA ou moduladores da transcrição. Este tipo de experimento foi crucial na determinação da atividade transativadora do gene *ie1*. O desenvolvimento de bibliotecas de plasmídeos contendo fragmentos genômicos de DNA viral e o uso destes nesta técnica, gradualmente permitiu identificar e isolar muitos dos genes com atividades transativadoras na transcrição. A partir desses experimentos, foram identificados pelo menos 18 genes (*ie1*, *ie2*, *lefs 1-11*, *dnapol*, *p143*, *p47*, *p35* e *39K*) que são exigidos para a transativação de genes da fase tardia e muito tardia (Todd *et al.*, 1996). Esta técnica também permitiu o descobrimento dos componentes específicos da RNA polimerase viral, composta por quatro genes: *p47*, *lef4*, *lef8* e *lef9* (Guarino *et al.*, 1998).

Em termos de avaliação da atividade transcricional dos promotores virais durante a infecção, a técnica mais próxima à atividade *in vivo* seria a construção de baculovírus recombinantes contendo promotores de genes virais regulando algum gene repórter passível de detecção e quantificação. Este desenho experimental permite avaliar a atividade de promotores dentro do contexto do genoma viral em ação, fornecendo informações diretamente aplicáveis aos usos biotecnológicos de baculovírus como

vetores de expressão de genes heterólogos (Rohrmann, 2011), além de elucidar a atividade destes promotores em células não permissivas à replicação viral (Morris & Miller, 1992).

Com a melhoria nas técnicas de sequenciamento de DNA e RNA, o descobrimento de genes repórteres mais sensíveis e o desenvolvimento de novas técnicas de identificação e quantificação de ácidos nucléicos, observou-se uma mudança no foco para longe dos estudos de genes transativadores transcricionais, um foco mais abrangente se formou, que busca observar a malha de interações gênicas que ocorrem simultaneamente, ao invés de pontuar a atividade de um elemento em relação a outro.

Na tentativa de elucidar o “programa transcricional” do baculovírus AcMNPV ao longo da infecção, um microarranjo foi concebido, utilizando 155 sondas de cDNA não redundantes representando as ORFs conhecidas. A este microarranjo foram hibridizados extrações de RNA total de células infectadas a cada 3 h da infecção. A análise deste arranjo resultou em uma classificação dos padrões globais de transcrição, em: 1 - genes com aparecimento precoce e rápido aumento durante fase precoce, 2 – genes com aparecimento precoce e aumento mediano na fase precoce até máximo, 3 – genes com aparecimento em fase precoce e aumento até o máximo na fase tardia, 4 – genes da fase tardia. Estes grupos também refletem a presença dos motivos de cada fase nos promotores, no Grupo 1, 70% dos promotores contém o motivo precoce CAGT, enquanto que no Grupo 4 apenas 31% contém a sequência CAGT. O inverso ocorre em relação ao motivo de fase tardia TAAG, que só ocorre em 20% dos promotores de ORFs do Grupo 1, enquanto que o Grupo 4 possui uma incidência de 65% deste motivo. Até 30 h p.i., 95% (149 de 156) dos genes já tinham atingido o máximo de sua atividade transcricional (Jiang *et al.*, 2006).

Recentemente, foi realizado um transcriptoma da expressão do baculovírus *Bombyx mori* NPV em células BM-N (Katsuma *et al.*, 2011) e os resultados são interessantes. Os transcritos derivados da infecção às 20 h p.i. cobrem 96% do genoma de 128000 pb, a distribuição de transcritos é similar entre a fita senso e antisenso, 55% dos motivos tardios TAAG são utilizados como INR e foram identificados 56 RNAs não codificantes (ncRNA) que são transcritos a partir de motivos precoces (7%) ou tardios (84%). Destes ncRNAs detectados, um quarto ocorrem em orientação antisenso próximo a extremidades 5' de ORFs conhecidas. Existe uma grande possibilidade que alguns destes ncRNAs tenham efeito regulador sobre a transcrição das ORFs associadas, o que significa mais um mecanismo regulatório da transcrição gênica durante a infecção dos baculovírus.

A realização de transcriptomas é especialmente útil para avaliar a ação que os baculovírus exercem sobre a transcrição de genes do hospedeiro. A infecção de AcMNPV em células IPLB-SF21-AE foi submetida a uma análise conjunta de microarranjo, sequenciamento de RNA e qPCR (Salem *et al.*, 2011). Alguns genes do hospedeiro tem sua transcrição aumentada, entre eles estão o grupo de genes *hsp70*, que codificam chaperonas cuja função está associada a resposta ao *stress* celular. Argumenta-se que o aumento na expressão destes genes ajudam o vírus a montar sua progênie. Foi observado que ao longo das primeiras 12 h de infecção a maioria dos genes do hospedeiro tiveram sua transcrição reduzida, incluindo genes conhecidos por terem função imune no inseto. Isto está correlacionado a redução da síntese de proteínas do hospedeiro ao longo da infecção, o que tem um efeito negativo sobre o retículo endoplasmático e a produção de proteínas transmembranas (Van Oers *et al.*, 2001).

1.5. Informações sobre as proteínas e seus promotores

1.5.1. CMV_{ie1}

A proteína IE1 é expressa em grande quantidade logo no início da infecção do Herpesvirus CMV, e é essencial para a replicação em células de mamíferos. A regulação deste gene e a atividade do promotor estão diretamente associados a atividade do *enhancer* que os acompanham, a desativação do *enhancer* em determinados tecidos permite que o vírus mantenha uma infecção latente dentro do organismo, mantendo o vírus em dormência até algum estímulo específico venha a reativar o *enhancer* e, por meio deste, aumentar a expressão do gene *ie1* (Meier & Pruessner, 2000), o que inicia uma cascata de expressão de genes virais transativados e reinicia a infecção viral.

A proteína IE1 (72 kDa) possui uma função transativadora da transcrição, agindo como elemento *trans* sobre promotores dentro do genoma do vírus CMV durante a infecção deste em células de mamífero suscetíveis, também atua como regulador da expressão de genes do hospedeiro (Markievicz *et al.*, 2004).

Este promotor é muito utilizado no sistema comercial de entrega gênica em células de mamíferos mediada por baculovírus recombinantes derivados do AcMNPV, conhecido por BacMAM (Kost & Condreay, 1999).

1.5.2. IE1

A proteína *immediate early 1* (IE1) é um dos elementos chaves da infecção de baculovírus em células de inseto. É uma proteína (67 kDa) presente em baculovírus da classe Alfa e Beta, e altamente conservada (Miele *et al.*, 2011). A estrutura terciária forma dímeros de IE1 com atividade de associação específica aos palíndromos contidos nas regiões homólogas (Nagamine *et al.*, 2005) e associação não específica a motivos de promotores da fase precoce (INR precoce e TATA box) (Slack & Arif, 2007). Estas

duas atividades resultam em múltiplas funções transativadoras como elemento *trans* de promotores da fase precoce (Pullen & Friesen, 1995), ressaltando que a proteína IE1 estimula a transcrição de qualquer promotor precoce mínimo que contenha um TATA box (Blissard & Rohrmann, 1991). A deleção deste gene por recombinação em bactérias gera DNA baculoviral incapaz de replicar em células de inseto suscetíveis (Rohrmann, 2011) assim é um dos genes essenciais para garantir a formação da progênie viral.

Não existem motivos de transcrição tardia TAAG próximos ao início da ORF, no entanto alguns trabalhos detectaram a atividade do promotor em fases tardias, surpreendentemente estes transcritos tardios se iniciam no INR de fase precoce CAGT, assim como os transcritos da fase precoce (Pullen & Friesen, 1995; Kovacs *et al.*, 1991). Os elementos *cis* capazes de modular esta expressão temporal bifásica não são conhecidos.

1.5.3. GP64

A proteína do envelope viral responsável pela fusão entre as membranas do vírus e da membrana do endossomo da célula hospedeira é uma proteína de 64 kDa denominada GP64, esta função é essencial para a propagação dos BVs dentro do hospedeiro, e dentro do grupo filogenético dos *Alphabaculovirus* Grupo I, a proteína GP64 é a única capaz de realizar a fusão de membranas e garantir a entrada do vírus na célula (Rohrmann, 2011), desta forma a proteína GP64 é conservada dentro dos *Alphabaculovirus* Grupo I. Esta proteína é expressa em momentos precoces e tardios da infecção (Blissard & Rohrmann, 1991), e é destinada a membrana plasmática onde fica ancorada até o egresso de partículas virais montadas do núcleo ao citoplasma, o contato destas partículas com a face interna da membrana plasmática coberta de GP64 induz o

brotamento da partícula viral em uma vesícula para o exterior da célula, formando a partícula viral madura denominada de BV (Rohrmann, 2011).

Como a formação de BVs ocorre nos momentos logo após a replicação do genoma viral, em aproximadamente 6 horas pós infecção (h p.i.), e em momentos muito tardios os vírions ficam retidos no núcleo para a inclusão nos corpos de oclusão, é razoável assumir que a expressão da proteína GP64 deve ocorrer dentro das primeiras 6 h p.i., o que de fato ocorre (Blissard & Rohrmann, 1991). Corroborando esta hipótese, existem resultados derivados de um baculovírus AcMNPV recombinante contendo o gene *gp64* sendo regulado por um promotor exclusivo da fase tardia, este recombinante possui uma produção de BVs reduzida em comparação ao AcMNPV selvagem cuja expressão de GP64 ocorre em momentos precoces da infecção (Washburn *et al.*, 2003).

1.5.4. VP39

O gene *vp39* codifica a proteína principal do capsídeo viral, com massa molecular de 42 kDa, a proteína VP39 se distribui sobre a superfície dos nucleocapsídeos (Russel *et al.*, 1991). Como a formação dos capsídeos ocorre no núcleo da célula, a proteína VP39 deve trafegar do sítio de síntese de proteínas no citoplasma para o estroma virogênico dentro do núcleo da célula. No núcleo, a proteína VP39 forma aglomerados em um padrão reticular, estes focos estão sempre associados à presença de DNA viral (Kawasaki *et al.*, 2004). Ainda não é claro como ocorre a encapsidação do DNA viral, no entanto, sabe-se que quando o nucleocapsídeo está formado, o DNA viral encontra-se supercondensado e associado à diversas proteínas, como P6.9 e IE1 (Rohrmann, 2011). Quando o nucleocapsídeo está maduro, ele deve trafegar do núcleo para a face interna da membrana plasmática, este trânsito ocorre pela associação entre o capsídeo viral e os microtúbulos periféricos do citoesqueleto da

célula, isto ocorre por meio de uma interação direta entre a proteína VP39 e a proteína motora Kinesin-1 (Danquah *et al.*, 2011).

Originalmente caracterizado como promotor da fase tardia (Morris & Miller, 1994), devido à falta de elementos INR da fase precoce em sua sequência e a presença de múltiplos elementos INR da fase tardia. O gene *vp39* não é transativado pela proteína IE1 sozinha, sem outras proteínas virais, ou *cis*-ativado por regiões homólogas (Ribeiro, Hutchinson & Miller, 1994; Ishiyama & Ikeda, 2010). Existem relatos de atividade na fase precoce do promotor VP39 do baculovírus AcMNPV (Theilmann & Stewart, 1991), no entanto, devido à existência de artigos muito citados e mais antigos que descreveram este promotor como um promotor da fase tardia, ainda é possível encontrar artigos recentes que relatam por citações que este é um promotor da fase tardia.

1.5.5. P6.9

A proteína P6.9 é encontrada associada ao DNA viral, no interior dos nucleocapsídeos (Tweeten, Bulla & Consigli, 1980), e associada ao estroma virogênico no núcleo da célula infectada (Wilson *et al.*, 1987, 1988; Peng *et al.*, 2012). É uma proteína conservada entre os nucleopoliedrovirus e granulovirus (Tweeten, Bulla & Consigli, 1980), com tamanho pequeno (44 aa, 6.9 kDa), rico em arginina (40%), serina e treonina (Rohrmann, 2011). O aminoácido arginina possui alta afinidade pelo esqueleto de fosfato na estrutura do DNA, proteínas chamadas de protaminas são encontradas em núcleos de espermatozoides de eucariotos associados ao DNA e também são ricas em resíduos de arginina, estes resíduos neutralizam a carga do DNA, enquanto que os resíduos de treonina e serina interagem dentro da protamina para manter a carga total neutra do complexo, permitindo a manutenção de uma estrutura DNA-proteína supercondensada e compacta (Wilson *et al.*, 1987).

A função da proteína P6.9 em baculovírus é a condensação do DNA viral para o empacotamento deste nos capsídeos em formação no estroma virogênico. Existe ainda uma função complementar, agora no momento inicial da infecção, quando o capsídeo viral é desnudado e o genoma é entregue ao núcleo, neste momento a proteína P6.9 é fosforilada, resultando em repulsão eletrostática entre o DNA e a P6.9, agora negativamente carregada devido à fosforilação. Ao fim deste evento, o DNA viral está livre para ser transcrito por fatores de transcrição do hospedeiro (Wilson *et al.*, 1985).

Existem evidências que a proteína P6.9, do baculovírus AcMNPV, pode atuar como um transativador de promotores da fase tardia da infecção, esta atividade é surpreendente pois as protaminas costumam ter uma ação epigenética de reduzir a transcrição devido à compactação do DNA a ser transcrito, no entanto, a ausência da proteína P6.9 durante a infecção reduz o nível de transcritos da fase tardia a níveis basais de expressão (Peng *et al.*, 2012).

1.5.6. P10

A proteína P10, tamanho de 10 kDa, é expressa abundantemente a partir de 12 h p.i. no citoplasma, após 20 h p.i. esta proteína se encontra tanto no citoplasma quanto no interior do núcleo onde forma filamentos associados a microtúbulos e estruturas em formato de tubo próximos à membrana nuclear (Rohrmann, 2011). Este não é um gene essencial para replicação viral, no entanto, a deleção resulta na formação de poliedros cuja superfície apresenta cavidades, de onde os vírions parecem ter sido removidos, além disto, os ODVs encapsidados apresentam um envelope incompleto (Gross, Russell & Rohrmann, 1994). A associação da proteína P10 com os microtúbulos do citoplasma e as estruturas resultantes desta associação não possuem uma função específica conhecida (Miller, 1997).

Por ser um gene não essencial, o *locus* do gene *p10* é muito utilizado para inserção de genes heterólogos com fins de expressão de proteínas, da mesma forma, o promotor do gene *p10* também é muito utilizado devido à sua força de expressão em momentos muito tardios da infecção. Este promotor, assim como o promotor *polh*, é inativo em extratos de proteínas derivado de células de inseto não infectadas (Weyer *et al.*, 1989).

O promotor *p10* de AcMNPV é um promotor INR+ de fase tardia e TATA+, em AcMNPV a sequência até -72 pb a partir do códon de iniciação da ORF P10 contém os elementos essenciais de funcionamento deste promotor. O elemento INR de fase tardia TAAG ocorre na posição -70 pb, enquanto que o elemento TATA ocorre na posição -85 pb. A deleção do elemento TATA não influencia negativa ou positivamente na expressão a partir do INR de fase tardia. A deleção do elemento INR de fase tardia extingue a atividade deste promotor (Weyer *et al.*, 1989).

1.5.7. POLH

O gene *polh* evoluiu duas funções altamente especializadas. A proteína POLH é o principal componente (95%) do cristal protetivo que forma os corpos de oclusão, além disto, a estrutura dos OBs garante proteção contra a solubilização, exceto quando expostos a um ambiente alcalino e redutor, similar ao encontrado no intestino médio das larvas de Lepidoptera (Leisy, Rohrmann & Beaudreau, 1986). Estas duas propriedades garantem a forma viável do vírus fora do hospedeiro, em períodos de ausência deste último. A importância deste gene é grande a nível ecológico, no entanto, o gene *polh* não é essencial para a replicação em células de inseto cultivadas *in vitro*, portanto a substituição da ORF do gene *polh* pela sequência de um gene de interesse resulta em um

baculovírus recombinante oclusão negativo, capaz de expressar grandes quantidades de proteína heteróloga, devido a regulação do forte promotor polh (Rohrmann, 2011).

Esta proteína possui um tamanho de 29 kDa e sua estrutura tridimensional foi resolvida recentemente. Para formar a matriz cristalina dos poliedros, primeiro três monômeros de POLH se associam por interações entre estruturas folha beta, formando uma estrutura trimérica no formato de cálice. Quatro destes trímeros se associam por pontes dissulfeto, formando um dodecâmero tetraédrico de proteínas POLH. Estes dodecâmeros são efetivamente as subunidades de montagem dos poliedros, a associação de dodecâmeros entre si ocorre de forma ordenada, pois as conexões entre as unidades dependem da formação de pontes de sal e o encaixe que garante a formação desta ligação exige o correto posicionamento entre os dodecâmeros. A dissolução dos poliedros em soluções alcalinas é atribuída à dissolução destas pontes de sal entre dodecâmeros POLH. Desta forma, é possível formar a estrutura organizada dos OBs, com características únicas como a simetria cúbica, uma matriz protéica de alta densidade pois o interior é praticamente livre de solventes, flexibilidade de montagem para permitir a inclusão de partículas virais e manter as funções da estrutura (Coullibaly *et al.*, 2009; Ji *et al.*, 2010).

O promotor polh é o promotor baculoviral mais estudado e utilizado quando discutimos expressão de proteínas em células de inseto ou larvas, devido a sua intensidade de expressão em momentos muito tardios da infecção. Em AcMNPV, o promotor polh é classificado como INR+ de fase tardia e TATA-, que possui um elemento DAR chamado de sequência *burst*, localizado na região 5' não traduzida do mRNA que se inicia no INR de fase tardia. Este promotor não é funcional em extratos de células de inseto não infectadas (Rankin, Ooi & Miller, 1988).

Em AcMNPV, o elemento INR de fase tardia ocorre a -52 pb a montante do primeiro codon da ORF POLH. A deleção da região -52 a -1 pb resulta em redução quase total dos níveis de expressão do promotor. Modificações na sequência INR ATAAG também resultam em redução drástica dos níveis de expressão. Portanto esta sequência ATAAG é essencial para a atividade do promotor. A sequência até -92 pb é considerada o *core* do promotor, isto é, deleção de regiões além a -92 pb não afetam a atividade do promotor (Rankin, Ooi & Miller, 1988).

O elemento DAR do promotor do gene *polh* (sequência *burst*) é importante para garantir a hiperexpressão do gene em momentos muito tardios da infecção. O gene muito tardia *factor 1 (vlf-1)*, transativador de promotores da fase muito tardia, codifica a proteína VLF-1, que interage com a sequência *burst*, estimulando a expressão dos promotores muito tardios (Yang *et al.*, 1999; Todd *et al.*, 1996). A repetição *in tandem* desta sequência *burst* a jusante do INR resulta em um promotor POLH modificado ainda mais eficiente (Kato *et al.*, 2012).

Já foram detectadas proteínas do hospedeiro *Bombyx mori* que interagem direta ou indiretamente com o promotor POLH do baculovírus BmNPV, a proteína PPBP (de *polyhedrin promoter binding protein*) é derivada do hospedeiro, no caso células derivadas de *Bombyx mori*, e possui forte afinidade pela sequência do promotor POLH (Ghosh *et al.*, 1998). Recentemente, duas novas proteínas que se associam ao promotor POLH de BmNPV foram identificadas utilizando o sistema *yeast one hybrid* e uma biblioteca de cDNA derivada de células BM-N, nomeadas de DBP e BmRPSA, o silenciamento destes genes resulta em redução na expressão de genes a partir do promotor POLH (Yu *et al.*, 2012).

1.5.8. HEL

O gene *helicase*, também conhecido por *p143*, codifica uma proteína de 143 kDa, cuja sequência de aminoácidos apresenta motivos típicos de proteínas motoras associadas ao desdobramento de fitas de DNA superenoveladas, chamadas de helicases (Lu & Carstens, 1991).

A proteína helicase cliva ATP em um domínio ATPase de sua estrutura, a energia liberada é usada para quebrar as pontes de hidrogênio entre as bases nitrogenadas do DNA, a separação das fitas permite que o complexo replicativo possa sintetizar as fitas complementares (Rohrmann, 2011). É um gene essencial para a replicação do DNA viral, pois certas mutações em sua sequência codante resultam em bloqueio na replicação do DNA viral (Liu & Carstens, 1999).

2. OBJETIVOS

2.1 Justificativa

Devido ao potencial biotecnológico do baculovírus AgMNPV, em seu uso extensivo como agente de controle biológico e como um promissor vetor de expressão de proteínas heterólogas, o estudo dos elementos transcricionais deste vírus é importante para o conhecimento da regulação da transcrição dos genes virais durante a infecção *in vitro* e *in vivo* o que gera um melhor conhecimento da biologia molecular destes vírus e fornece bases para o uso biotecnológico como vetor de expressão.

2.2 Objetivos gerais

O objetivo geral deste projeto é a análise da atividade de diferentes promotores do AgMNPV e do promotor CMVie1 do herpesvirus CMV, em células de inseto e de mamíferos, durante a infecção de vírus AgMNPV recombinantes contendo o gene repórter da enzima luciferase de vaga-lume, sob o comando destes promotores.

2.3 Objetivos específicos

- Isolar os promotores IE1, GP64, VP39, P6.9, HEL, P10 e POLH do baculovírus AgMNPV
- Isolar o promotor CMVie1 contido no plasmídeo pRLCMV (Promega)
- Subclonar os promotores a montante do gene luciferase de vagalume
- Clonar os insertos promotor-FLUC no plasmídeo de transferência p2100
- Isolar os baculovírus AgMNPV recombinantes contendo os **insertos** promotor-FLUC
- Quantificar a atividade de cada promotor durante a infecção de células de inseto cultivadas *in vitro*.
- Quantificar a atividade de cada promotor durante a infecção de larvas *Anticarsia gemmatalis* e *Spodoptera frugiperda*.
- Avaliar a capacidade de transdução e atividade do baculovírus AgMNPV recombinante contendo o promotor CMVie1 regulando a proteína FLUC em células de mamíferos

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Vírus

Os baculovírus utilizados neste trabalho foram: o baculovírus AgMNPV-2D (Zanotto *et al.*, 1992), considerado o vírus tipo selvagem desta espécie, o baculovírus recombinante oclusão negativo vAgGAL (Ribeiro *et al.*, 2001), que contém o gene *beta-galactosidase* clonado em substituição ao gene *polh* e utilizando o promotor deste gene. O baculovírus recombinante oclusão positiva vAgP10FLUC, que contém o gene *luciferase* substituindo o gene *p10* no *locus* deste último (Neves *et al.*, 2005).

3.2. Células

As linhagens celulares derivadas de insetos utilizadas neste trabalho são: UFL-AG-286 derivada de *Anticarsia gemmatalis* crescidas em meio TC-100 (Sieburth & Maruniak, 1988), BTI-Tn-5B1-4 derivada de *Trichoplusia ni* em meio TC-100 (Granados *et al.*, 1994), IPLB-SF21-AE derivada de *Spodoptera frugiperda* e crescida em meio TC-100 (Vaughn *et al.*, 1977), IPLB-Ld652Y derivada de *Limantria dispar* e crescida em meio TC-100 (Goodwin, Tompkins & Mccaulin, 1978), BM5 derivada de *Bombyx mori* crescidas em meio Grace (Grace, 1967) e C636 derivada do mosquito *Aedes albopictus* crescidas em meio L-15 (Igarashi *et al.*, 1978). Todos os meios de cultura de células de inseto são suplementados com 10% de soro fetal bovino (FBS, Gibco).

As células de mamíferos (humanos) utilizadas neste trabalho foram: células derivadas de adenocarcinoma de mama MCF-7 (HTB-22) e derivadas de carcinoma de próstata DU145 (HTB-81), ambas adquiridas pelo ATCC, utilizando o meio de cultura DMEM (Gibco) suplementado com 10% soro fetal bovino (Gibco).

3.3. Isolamento dos promotores virais por PCR e clonagem no vetor de transferência p2100FLUC

O gene *fluc* do vaga-lume (*firefly luciferase: fluc*, luciferase, Promega), com extensão de 1,7 kpb (pares de quilobases), foi utilizado como gene repórter para a análise do perfil de ativação dos promotores de genes do AgMNPV. Em um trabalho anterior do laboratório (Pinedo, 2004), diversos promotores virais foram isolados por PCR e clonados no plasmídeo pGEM-T Easy seguindo as instruções do fabricante (Promega) e, de forma similar, o gene *fluc* também foi clonado em pGEM-T Easy, gerando o plasmídeo pGEMFLUC, o que tornou possível subclonar o gene *fluc* a jusante (*downstream*) aos promotores isolados (Pinedo, 2004).

O plasmídeo pIE1FLUC com tamanho de 5183 pb (figura 4) foi digerido pelas enzimas *ApaI* e *SacI* seguindo as instruções do fabricante (Promega), liberando um fragmento de 2327 pb composto pelo promotor do gene *ie1* do baculovírus AgMNPV (466 pb) a jusante do gene *fluc*. O plasmídeo pGP64FLUC de 5106 pb (figura 4) foi digerido pelas enzimas *SacI* e *NcoI* (Promega), resultando em um fragmento de 2165 pb, contendo o promotor do gene *gp64* (350 pb) a jusante do gene *fluc*. As digestões foram tratadas com 1 unidade de T4 DNA polimerase (Promega), dNTP (10 µM) e incubadas durante 20 min a 25°C, assim preenchendo as extremidades coesivas das digestões, tornando-as abruptas. As reações foram submetidas a eletroforese em gel de agarose (0,8%) como descrito em Sambrook & Russell (2001) e as bandas correspondentes aos insertos promotor-*fluc* discutidos acima foram eluídas utilizando kit de eluição GFX, seguindo as instruções do fabricante (GE).

O DNA do plasmídeo de transferência p2100 de 5100 pb (figura 4), contendo um fragmento do *locus* da poliedrina do baculovírus AgMNPV de 2100 pb, foi purificado em grande escala por centrifugação em gradiente de cloreto de cério a partir de colônias de *Escherichia coli* recombinantes, segundo Sambrook & Russell (2001), e digerido com a enzima *EcoRV* (Promega) que cliva o plasmídeo uma única vez linearizando-o com extremidades abruptas 158 pb a montante (*upstream*) ao códon de iniciação do gene da poliedrina (*polh*), sem interromper o gene da poliedrina e seu promotor. O plasmídeo linearizado foi tratado com a enzima fosfatase alcalina CIAP (Promega), de forma a retirar os fosfatos das extremidades 5' e impedir a religação do plasmídeo, assim diminuindo o *background* de colônias que contêm plasmídeos não recombinantes (Sambrook & Russell, 2001).

O plasmídeo p2100 linearizado no sítio da enzima de corte abrupto *EcoRV*, e os insertos contendo os promotores a montante do gene luciferase de vagalume, foram

misturados numa razão 3:1 de inserto:plasmídeo, à esta mistura foi adicionada a enzima T4 DNA ligase (3 unidades, Promega) e incubada em 25°C por 4 h.

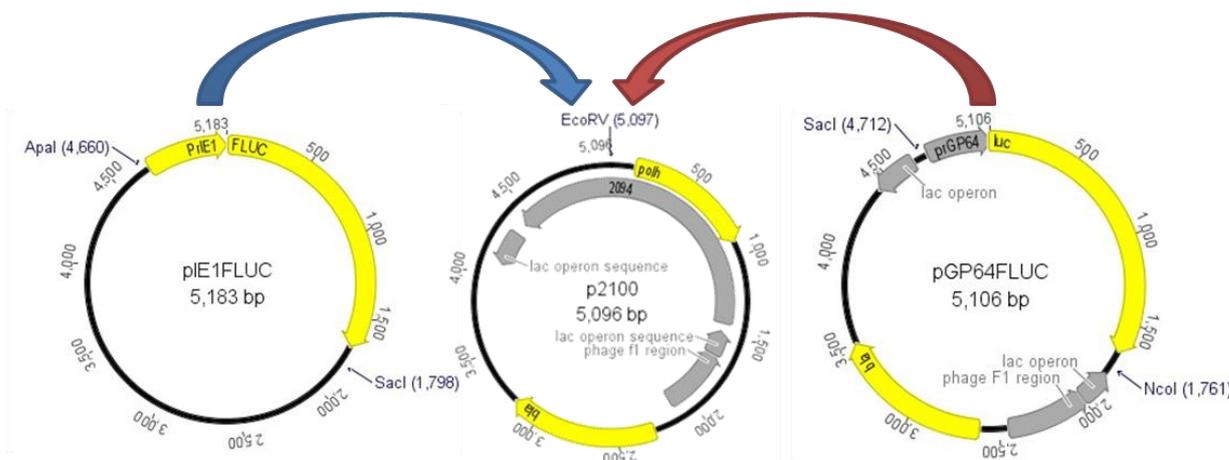


Figura 4: Estratégia de clonagem dos insertos promotor gp64 ou iel a montante do gene luciferase de vagalume no plasmídeo de transferência por recombinação homóloga p2100 (Hallwass, 2005). As enzimas de restrição realçadas foram utilizadas para excisão dos insertos contidos nos plasmídeos pIE1FLUC e pGP64FLUC (Pinedo, 2004). O alvo para clonagem no plasmídeo p2100 foi o sítio único da enzima de corte abrupto *EcoRV*, a montante do gene *polh*.

As reações de ligação foram transformadas em bactérias *E. coli* quimicamente competentes TOP10 (Invitrogen), preparadas pelo método Cloreto de Rubídio (Roychoudhury, Basu & Sengupta, 2009) e selecionadas pela inclusão de ampicilina (100 µg/mL) em meio de cultura LB sólido (Luria-Bertani Broth), composto por 1% Triptona, 0.5% Extrato de levedura, 1% NaCl, pH 7.0, 1,5% ágar em água destilada. As colônias resultantes foram transferidas para meio LB líquido (mesma composição que o LB sólido sem o solidificador ágar) contendo ampicilina, e depois de 16 h em shaker a 37°C, 200 rpm, os plasmídeos foram isolados por mini preparação (*miniprep*) por lise alcalina e analisados em gel de agarose 0,8% (Sambrook & Russell, 2001), as colônias contendo plasmídeos com tamanhos maiores que o plasmídeo p2100 (5 pkb), de aproximadamente 7 pkb, foram transferidas para 25 mL de meio LB e incubados a 37°C por 16 h. As colônias resultantes, resistentes à ampicilina, foram isoladas com palitos autoclavados e transferidas a tubos cônicos contendo 20 mL de meio de cultura LB, que foram incubadas em shaker a 37°C com rotação 200 rpm, por 16 h. As culturas

bacterianas foram submetidas a extração de DNA em média escala (*midiprep*) seguindo o protocolo descrito em Sambrook & Russell (2001). Para garantir maior pureza na purificação do DNA plasmidial, foram realizadas cromatografias por adsorção de DNA à sílica (Celite) por meio de agente caotrópico (Guanidina-HCl 8 M), lavagens com álcool etílico 75% e eluição do DNA com água milliQ estéril (Borodina, Lehrach & Soldatov, 2003).

Os plasmídeos purificados foram digeridos por enzimas de restrição e os padrões resultantes em gel de agarose foram comparados a sequências previstas *in silico* pelo programa Vector NTI (Invitrogen) e digestões do plasmídeo p2100 como controle negativo.

Com o plasmídeo construído p2100IE1FLUC, de 7421 pb (figura 5), foi observada a presença de sítios de restrição únicos das enzimas *HindIII* e *XmaI* flanqueando o promotor do gene *ie1*. Isto permitiu remover enzimaticamente apenas a sequência do promotor *ie1*, linearizando o plasmídeo e permitindo a entrada de outro promotor por clonagem direcional. Considerando o alvo selecionado, oligonucleotídeos específicos foram desenhados para amplificação e clonagem dos promotores dos genes *vp39* (290 pb), *hel* (486 pb), *polh* (421 pb), *p10* (351 pb), *p6.9* (483 pb) do baculovírus AgMNPV, e para o promotor CMV_{ie1} (801 pb), contido no plasmídeo pRLCMV (Promega), conforme Tabela 1.

A estratégia de clonagem requer que o *primer forward* (5' ou sense do amplicon) contenha em sua extremidade 5' a sequência para clivagem da enzima *HindIII*, enquanto o *primer reverso* (3' ou antisense do amplicon) contém em sua extremidade 5' a sequência para clivagem da enzima *XmaI*.

Tabela 1: Lista dos oligonucleotídeos utilizados. Realçado em azul a sequência de clivagem da enzima de restrição *HindIII*, em vermelho a sequência da enzima *XmaI*.

Nome	Tamanho (pb)	Sequência do oligo	Função
FLUC RealTime Rev	20	TCGTCCCAGTAAGCTATGTC	Confirmação vAg recombinantes
pr6.9-470FwrHindIII	34	ACTGAAGCTTCGCCAGCCCTGTGATGCGTTACG	Isolamento do promotor P6.9,
pr6.9RevXmal	34	ATTACCCGGGAAGTGTTTTACAATGTAGCTTTAA	confirmação vírus vAgP6.9FLUC
prCMVie1-810FwrHindIII	34	ATGCAAGCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGGC	Isolamento do promotor CMVie1,
prCMVie1RevXmal	35	ATTACCCGGGTAGTGATCTGACGGTTCCTAAACG	confirmação vírus vAgCMVFLUC
prHEL-470FwrHindIII	35	AAGCAAGCTTAAATAGTTGATAATGTCCATGATTG	Isolamento do promotor HEL,
prHELRevXmal	34	ATTACCCGGGTGGTAATTGCGTTTTAATGGCGC	confirmação vAgHELFLUC
prP10-347FwrHindIII	36	AAGCAAGCTTGGTGCCAGTGACGGCGTGCAGAAAG	Isolamento do promotor P10
prP10RevXmal	35	ATTACCCGGGTGAAATAAATACTAATAATTTTG	confirmação vAgP10FLUC
prPOLHFwrHindIII+4	31	AAGCAAGCTTATTTGGAGTGTTTGTACGATT	Isolamento do promotor POLH,
prPOLHRevXmal+4	35	ATTACCCGGGAGTTATAGCAAATTTACTACAAAG	confirmação vAgPOLHFLUC
prVP39-246FwrHindIII	37	AAGCAAGCTTTTTTCGCGCCACACAAGCGGCACCAACG	Isolamento do promotor VP39,
prVP39RevXmal	36	TTACCCGGGTTTGCTACAATGGACGACTTTGTGATT	confirmação vAgVP39FLUC
IE1-459	19	GCTATGCACGCGCAATCCG	Confirmação vAgIE1FLUC
prmgp64F-341	23	GGATCCATTTTGATGAAGGTCTT	Confirmação vAgGP64FLUC

A amplificação destes promotores, a partir do genoma do AgMNPV selvagem, purificado pelo método de isolamento de DNA viral a partir de BVs conforme O'Reilly *et al* (1992), por PCR, seguiu os seguintes parâmetros de ciclo: 95°C / 2 min, 35 ciclos de desnaturamento a 95°C / 30 seg, anelamento a 55°C / 20 seg e extensão a 72°C / 1 min, um ciclo de extensão final a 72°C / 5 min e, ao fim, conservação da amostra a 4°C. As reações de PCR foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 0.8% e coradas com brometo de etila, revelando sob a luz UV a amplificação dos promotores citados (Figura 8), que foram então eluídos pelo kit de eluição GFX (GE Healthcare), seguindo instruções do fabricante.

Os fragmentos de DNA contendo os promotores isolados por PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0.8%, e submetidos a reações de dupla digestão pelas enzimas *HindIII* e *XmaI* (Promega). As reações foram preparadas, contendo 1 µg de cada promotor isolado por PCR, utilizando o Buffer B (Promega), 5 unidades de cada enzima e incubadas por 16 h para garantir uma digestão completa de ambas extremidades. A mesma digestão foi realizada para o plasmídeo p2100IE1FLUC, purificado por cromatografia de adsorção de DNA à sílica (Celite) a partir de bactérias

DH5- α (Invitrogen) transformadas, utilizando 1 μ g do plasmídeo p2100IE1FLUC, em condições iguais às digestões dos fragmentos de PCR. Esta digestão dupla do plasmídeo foi submetida a gel de agarose 0.8% e a banda correspondente ao plasmídeo p2100IE1FLUC digerido (6917 pb) foi eluída utilizando o kit GFX (GE Healthcare), conforme instruções do fabricante. Todos materiais eluídos foram quantificados por visualização em gel de agarose 0.8%, para estimarmos a quantidade e proporção de cada DNA antes das reações de ligação.

Para construir os plasmídeos p2100CMVFLUC (7698 pb), p2100P6.9FLUC (7390 pb), p2100VP39FLUC (7188 pb), p2100P10FLUC (7248 pb), p2100HELFLUC (7383 pb) e p2100POLHFLUC (7318 pb), foram realizadas reações de ligação de DNA, misturando 200 ng do plasmídeo p2100IE1FLUC linearizado (sem o promotor *ie1*) e eluído, com 500 ng dos fragmentos de promotores eluídos a partir das ampliações por PCR, além de 4 unidades da enzima T4 DNA ligase (Sigma) e o tampão fornecido pelo fabricante, em um volume total de 20 μ L. As reações de ligação foram incubadas a 25°C por 16 h, uma alíquota de 5 μ L destas reações foram transformadas em bactérias quimicamente competentes TOP10 (Invitrogen), preparadas pelo método Cloreto de Rubídio (Roychoudhury, Basu & Sengupta, 2009).

Basicamente, a alíquota de 5 μ L do DNA das ligações foram misturados com 200 μ L de células TOP10 quimicamente competentes conservadas em microtubos de 1,5 mL (Eppendorf) a -80°C, o tubo foi mantido por 30 min no gelo (-4°C) e depois da incubação foi submetido a choque térmico de 90 s a 42°C em banho maria, imediatamente depois transferido ao gelo por 3 min. Ao tubo foram adicionados 800 μ L de meio de cultura LB líquido e o tubo foi incubado em shaker a 200 rpm e 37°C por 1 h. Durante esta incubação, foram preparadas placas de Petri com meio de cultura LB sólido e ampicilina a concentração 100 μ g/mL. Após 1 h de incubação no shaker, uma

alíquota de 200 μ L a partir do conteúdo dos tubos das transformações foi adicionada sobre o meio de cultura sólido contendo ampicilina e espalhada usando uma alça de vidro. Estas placas foram então incubadas a 37°C por pelo menos 16 h a 37°C. As colônias resultantes, resistentes à ampicilina, foram isoladas com palitos autoclavados e transferidas à tubos cônicos contendo 20 mL de meio de cultura LB. As culturas bacterianas foram submetidas à extração de DNA em média escala (*midiprep*) seguindo o protocolo descrito em Sambrook & Russell (2001) e subsequente cromatografia por adsorção à sílica (Borodina, Lehrach & Soldatov, 2004). A integridade e tamanho dos plasmídeos purificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0.8%.

Os plasmídeos isolados que apresentavam tamanhos relativos aos esperados conforme simulação *in silico*, e comparados com o plasmídeo p2100IE1FLUC por eletroforese em gel de agarose 0,8%, foram então submetidos a digestões com enzimas de restrição (figuras 9 e 10) para confirmar a presença dos promotores desejados. Para cada caso foram escolhidas enzimas de restrição (segundo os protocolos definidos pelos fabricantes) que preferencialmente clivam dentro dos promotores e fora dos mesmos, assim garantindo especificidade da sequência do promotor. Os padrões de restrição foram comparados à previsão *in silico* das digestões. Estes procedimentos permitiram identificar, isolar e amplificar os plasmídeos de transferência p2100CMVFLUC, p2100P6.9FLUC, p2100VP39FLUC, p2100P10FLUC, p2100HELFLUC e p2100POLHFLUC.

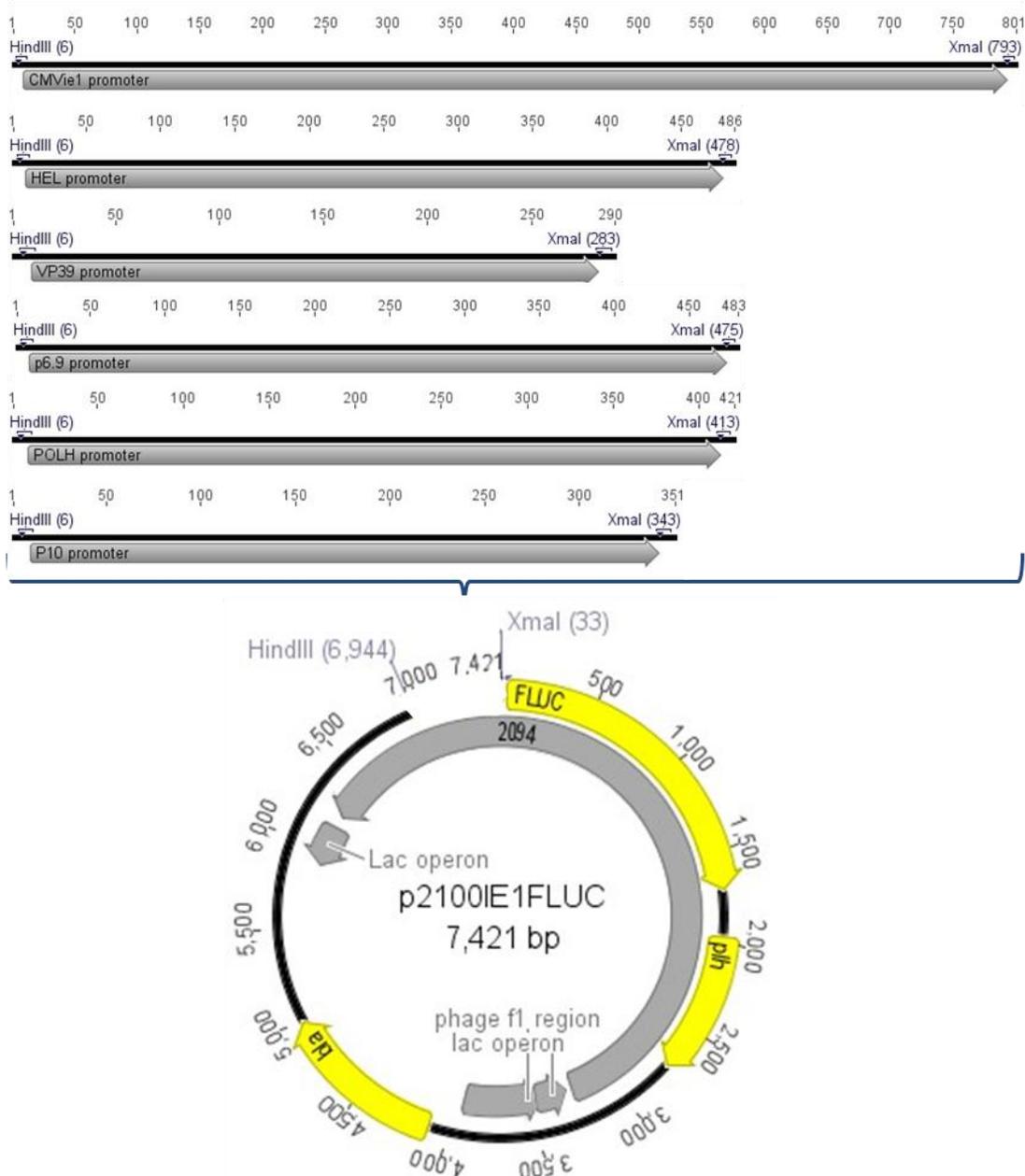


Figura 5: Estratégia de clonagem dos promotores vp39, p6.9, hel, polh, p10 e CMVie1 no plasmídeo de transferência p2100IE1FLUC. As enzimas *HindIII* e *XmaI*, realçadas, clivaram e removeram o promotor IE1, deixando o plasmídeo livre para clonagem direcional dos fragmentos de PCR a montante do gene FLUC.

3.4. Construção dos vírus recombinantes por recombinação homóloga em células de inseto

Os DNAs dos plasmídeos recombinantes contendo os diferentes promotores foram cotransfectados em células de inseto com o DNA do vírus recombinante vAgGal (Ribeiro *et al.*, 2001). Para cada cotransfecção, uma placa estéril de 35 mm para cultura de células foi semeada com $0,5 \times 10^6$ células UFL-AG-286 em 5 mL de meio TC-100

(Gibco) com 10% de soro fetal bovino (FBS, Invitrogen) e incubadas a 27°C até que as células aderissem ao fundo da placa.

Os plasmídeos para recombinação construídos, p2100GP64FLUC, p2100IE1FLUC, p2100CMVFLUC, p2100P6.9FLUC, p2100VP39FLUC, p2100P10FLUC, p2100HELFLUC e p2100POLHFLUC e o DNA do baculovírus recombinante vAgGAL (Ribeiro *et al.*, 2001), purificado a partir de sobrenadante de células infectadas contendo a forma BV do vírus (O'Reilly *et al.*, 1992), foram diluídos na concentração 1 µg vírus : 5 µg plasmídeo em 250 µL de meio TC-100 (HIMEDIA) sem soro e 10 µL de lipossomos para transfecção (Cellfectin II - Invitrogen) em 250 µL de meio de cultura TC-100 (HIMEDIA) sem soro, misturados e incubados a 27°C durante 15 min para a formação dos complexos de lipossomo e DNA, enquanto que 2 mL do meio de cultura das placas preparadas foram removidos cuidadosamente, assim o meio sem soro com a mistura de DNA plasmidial de transferência, DNA viral (vAgGAL) e lipossomos foram adicionados à monocamada de células UFL-AG-286 na placa de 35 mm, para permitir adsorção dos complexos à membrana das células. Após 3-4 h de incubação a 27°C, foram adicionados 2 mL de meio TC-100 com soro e as placas foram incubadas a 27°C, até o aparecimento dos efeitos citopáticos da infecção celular a partir da replicação do DNA do vírus transfectado, observadas por microscópio de luz invertido Axiovert 100 (Zeiss).

Após a confirmação da infecção e fenótipos desejados na cotransfecção, uma nova placa de 35 mm contendo células UFL-AG-286 foi preparada e infectada com o sobrenadante da cotransfecção, esta “segunda infecção” serve como confirmação de que a cotransfecção realmente gerou partículas infectivas recombinantes, além de amplificar os vírus recombinantes para plaqueamento em diluição seriada.

3.5. Isolamento dos vírus recombinantes por diluição seriada

Os plasmídeos de transferência baseados no p2100 e cotransfectados junto ao genoma do vírus recombinante vAgGAL (cujo fenótipo não possui corpos de oclusão) resgatam o fenótipo OB positivo do genoma AgMNPV selvagem e portanto permitem a detecção do recombinante oclusão positivo, em um background de vírus vAgGAL oclusão negativo. A observação dos fenótipos de oclusão das infecções foi realizada utilizando o microscópio Zeiss invertido (Axiovert 100), acoplado com câmera digital AxioCam Mrc (Zeiss) conectada a um computador *desktop* contendo o programa AxioVision.

O fenótipo luciferase positivo também serve como marcador de detecção do recombinante pela lise das células infectadas pela mistura de vírus, adição de luciferina e medição em luminômetro (conforme protocolo da seção 3.7.1).

Com o sobrenadante da primeira infecção derivada da cotransfecção (mistura contendo pequena proporção de vírus recombinante em relação ao vírus vAgGAL) iniciou-se o processo de isolamento do recombinante desejado pela técnica *end-point dilution*, conforme descrito em O'Reilly *et al.* (1992). Resumidamente, o sobrenadante contendo partículas infectivas é diluído em meio de cultura estéril até o ponto em que existam poucas partículas infectivas por volume, estas diluições são usadas para infectar células UFL-AG-286 em uma placa de 96 poços. Desta forma, a infecção da mistura de vírus em altas diluições pode isolar gradualmente o recombinante pela observação dos fenótipos de infecção desejados em cada um dos 96 poços da placa contra o *background* de vírus não recombinantes, o sobrenadante do poço de maior diluição com os fenótipos corretos foi usado para compor uma nova placa e nova diluição. Pelo menos 3 diluições/placas sequenciais foram necessárias para isolar os vírus recombinantes neste trabalho.

Para realizar as diluições seriadas, o inóculo viral é diluído em série até pelo menos 10^{-6} em meio de cultura TC100, enquanto que 2×10^6 células UFL-AG-286 em um volume de 2 mL, foram misturados a 22 mL de meio de cultura TC-100 contendo 10% FBS. Para cada fileira de uma barca de multipipetadora de 12 ponteiros estéril, foram adicionados 12 μ L de cada diluição, e a mistura de células com inóculos diluídos foram então despejados com ajuda da multipipetadora em uma placa de 96 poços, fileira por fileira.

3.6. Amplificação, isolamento do DNA viral e titulação dos inóculos virais recombinantes

Após constatação do isolamento dos vírus recombinantes por *end-point dilution*, o sobrenadante da última diluição foi usado para infectar uma placa de 100 mm contendo 4×10^6 células UFL-AG-286 e 15 mL de meio de cultura TC-100 (HIMEDIA) com soro fetal bovino, durante 7 dias, a 27°C. O meio de cultura desta infecção foi transferido a um tubo tipo cônico de 15 mL e centrifugado (8000 g, 8 min) para formar um sedimento de restos celulares, enquanto o sobrenadante contendo as partículas infectivas foi transferido para um tubo novo. Estes estoques virais foram mantidos a 4°C para uso nas análises de expressão de luciferase.

A titulação destes estoques foi realizada pela técnica *end-point dilution* (TCID₅₀), em que diluições do estoque viral são usadas para infectar poços de uma placa de 96 poços contendo células UFL-AG-286, sendo que o procedimento é similar ao preparo das diluições seriadas para purificação do vírus (seção 3.5), e pela contagem da presença de infecção ou não dos poços de cada diluição é possível calcular o número de partículas formadoras de placas, ou PFU (O' Reilly *et al.*, 1992), o que permite a utilização dos inóculos virais na forma de multiplicidade de infecção por célula (MOI,

multiplicity of infection). Para realizar os cálculos foi utilizada uma planilha em Excel derivada de O' Reilly *et al.* (1992), que por sua vez é baseada na técnica desenvolvida por Reed & Muench (1938).

3.7. Ensaios de detecção da atividade de luciferase em células de inseto infectadas com AgMNPV recombinantes

A enzima quimioluminescente *firefly* luciferase é uma proteína derivada do vaga-lume *Photinus pyralis* cujo gene foi isolado e é comercializado na forma de plasmídeo com diversas modificações na sequência do gene para retirar motivos de direcionamento aos lisossomos e de aumento na eficiência da reação enzimática (Allard & Kopish, 2008). A atividade quimioluminescente é resultado da associação entre o monômero protéico Luciferase, solúvel no citoplasma de célula eucariótica, uma molécula de ATP, O₂ e o reagente D-luciferina. ATP e O₂ são componentes intrínsecos das células enquanto que a enzima luciferase e D-luciferina são moléculas raras entre os organismos vivos, sendo encontradas em alguns insetos da ordem Coleoptera como o vaga-lume *Photinus pyralis*.

Neste trabalho, foi utilizado o gene da enzima FLUC derivada do plasmídeo pCMVFLUC (Promega), clonada por Pinedo (2004), gerando o plasmídeo pGEMFLUC. Os reagentes de lise celular e a D-luciferina fazem parte do kit luciferase Assay Reagent (Promega), que contém o tampão de lise Cell Culture Lysis Reagent (CCLR) e D-luciferina ressuspensa no tampão fornecido pelo fabricante. O luminômetro utilizado foi o Turner TD-20/20 (Turner), com as seguintes configurações de leitura: tempo de integração 20 segundos, sensibilidade 50%. Os dados surgem como Unidades de Luminescência Relativa (RLU, Relative Light Units).

3.7.1. Ensaio de medição por lise

O ensaio típico da atividade da enzima luciferase envolve a expressão do gene repórter *fluc* a partir do vetor de expressão em células. Em diferentes tempos após o tratamento inicial as células são lisadas, liberando o conteúdo citoplasmático, o extrato celular é misturado ao reagente D-luciferina e a luminescência derivada deste extrato é medido em luminômetro. Quanto mais luciferase for produzida pelas células, maior a luminescência medida a partir do extrato.

Para preparar uma placa de 12 poços, primeiro foram adicionados a tubo cônico de 50 mL, $2,5 \times 10^6$ células UFL-AG-286 ressuspendidas em 5 mL de meio TC-100 contendo 10% FBS, 7 mL de meio de cultura TC-100 e inóculo viral contendo MOI 10, isto é, 10 partículas virais para cada célula. Desta mistura foram semeados 1 mL em cada poço da placa de 12 poços (compondo então $2,08 \times 10^3$ células por poço). Este é o tempo 0 h após a infecção (h p.i.).

Os momentos de detecção foram de 1, 3, 6, 9, 12, 15, 24 e 32 h p.i., que encompassam todas as fases da infecção, os meios de cultura de 3 poços de cada placa, cada uma infectada com um recombinante diferente, foram coletados e descartados, sem interferir na monocamada de células aderidas ao fundo do poço.

No caso das células de mamíferos (humanos) avaliadas, o preparo do ensaio se inicia semeando 2×10^5 células derivadas de adenocarcinoma de mama MCF-7 (HTB-22) e derivadas de carcinoma de próstata DU145 (HTB-81) em cada poço de uma placa de 12 poços, utilizando o meio de cultura DMEM (Gibco) suplementado com 10% soro fetal bovino (Gibco). Após 6 h, as células se aderem ao fundo da placa, então sendo adicionado o inóculo viral do baculovírus vAgCMVFLUC, sob a multiplicidade de infecção 10 e 30, e este se torna o tempo zero h pós transdução (h p.t.). Em seguida, a 6, 12 e 24 h p.t., o meio de cultura de 3 poços foi removido e descartado.

Foram adicionados 100 μ L de reagente de lise CCLR à monocamada, as células foram ressuspensas neste tampão de lise imediata e o extrato celular foi transferido ao tubo eppendorf de 1,5 mL. A este extrato foram adicionados 10 μ L do reagente D-luciferina e o tubo foi colocado na câmara de medição do luminômetro Turner TD-20/20. A medição foi feita utilizando os seguintes parâmetros: 20 s de tempo de integração e 50% de sensibilidade. Os dados coletados foram plotados na forma de gráficos de barra, utilizando o programa Excel 2007 (Microsoft), que mostram a luminescência emitida em unidades luminosas relativas (RLU), derivada da atividade da enzima luciferase expressa durante a infecção, considerando o desvio padrão em relação à média das triplicatas de cada hora de medida.

3.7.2. Ensaio de medição contínua

Uma técnica simples para medição contínua da luminescência derivada da infecção pelos recombinantes construídos em uma mesma amostra de células de inseto foi desenvolvida neste trabalho. Em comparação com a metodologia anterior, em que é detectada a luminescência do extrato das células de inseto infectadas em diferentes momentos pós-infecção, o que implica em medições de populações de células distintas mas infectadas com a mesma quantidade de determinado vírus recombinante, a metodologia de medição contínua permite avaliar a luminescência sendo emitida em tempo real, isto é, a luminescência da mesma população de células de inseto ao longo da infecção é monitorada, sem lisar o material.

O princípio desta técnica reside em suplementar cada meio de cultura, adicionando D-luciferina na concentração 20 mM (0,15 mg em 50 mL), depois os meios foram esterilizados em filtros de 0,22 μ m.

Um dia antes do ensaio, o meio de cultura sobre as células em crescimento em garrafas 25 cm², foi cuidadosamente removido, e o meio modificado contendo luciferina, foi adicionado sobre as células. Isto permite que as células se adaptem e absorvam a luciferina contida no meio. No dia seguinte, as células foram ressuspensas por pipetagem e 500 µL (equivalente a 500 mil células) foram transferidos para tubos eppendorf de 2,5 mL transparentes e de fundo chato. Aos tubos foram adicionados os inóculos virais, sob a MOI 1. Este é o momento 0 h p.i. e início do ensaio. Os tubos são mantidos a 27°C em compartimento escuro devido a hidrólise da molécula luciferina induzida pela luz.

A luminescência foi então, detectada utilizando o luminômetro Turner TD20/20 (20 s de integração, sensibilidade 50%), o que resultou em um série de medições da mesma amostra ao longo do tempo de infecção. As medições são enviadas do luminômetro Turner TD20/20 diretamente para uma planilha do programa Excel (Microsoft) pelo software SIS380 (Promega). O resultado de cada medição possui um *timecode*, isto é, um valor numérico que representa a hora exata da medição. Desta forma, é possível plotar gráficos X/Y relacionando os valores de luminescência em unidades luminosas relativas (RLU) e o tempo exato de cada medição, o que forma séries temporais representativas da atividade de cada promotor durante a infecção de uma população de células de inseto.

3.8. Ensaio de infecção de lagartas *Anticarsia gemmatilis* e *Spodoptera frugiperda*

3.8.1. Determinação da luminescência derivada da infecção da hemolinfa de larvas de lepidópteros

Para determinar a atividade dos promotores durante a infecção de larvas de inseto, foram realizados ensaios de infecção por injeção de inóculo viral em larvas de

Anticarsia gemmatilis e *Spodoptera frugiperda*, no 3^o ínstar de desenvolvimento. Para detectar a luminescência sendo produzida pela infecção das larvas, foi optado coletar uma pequena fração da hemolinfa por um simples sangramento por perfuração em triplicatas para cada tempo medido e para cada vírus recombinante (totalizando 180 larvas *Anticarsia* e 60 larvas *Spodoptera*).

As larvas de *Anticarsia gemmatilis* e *Spodoptera frugiperda* foram cedidas pela Dra. Maria Elita Batista de Castro da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Brasília, DF), ainda em primeiro ínstar. As larvas foram mantidas em potes de plástico, com pedaços de dieta sólida baseada em soja (Greene *et al.*, 1976).

Quando as larvas atingem o terceiro ínstar, é possível manipular e injetar o inóculo viral na hemolinfa das lagartas sem causar danos e com alto número de sobreviventes. Os inóculos virais foram diluídos para a concentração 1×10^7 PFU/mL com meio de cultura TC100 contendo 10% FBS, estes inóculos diluídos foram transferidos para seringas hipodérmicas. A injeção é feita no segundo par de patas, com cuidado para não perfurar o intestino, em cada larva foram injetados 50 μ L, que é a marcação mínima da seringa, e correspondem a 5×10^5 PFU injetadas. Isto inicia o ensaio de infecção, 0 h p.i..

Para medir a atividade dos promotores, nas 24, 48, 72 e 96 h p.i., 3 larvas infectadas com cada um dos vírus utilizados no experimento foram coletadas para medição. Como preparo inicial foram distribuídos 50 μ L de tampão de lise CCLR em placas de 96 poços opacas. Com muito cuidado, as cutículas foram perfuradas com uma agulha de seringa hipodérmica, no segmento central no lado ventral da lagarta, e com ajuda de uma micropipetadora, 5 μ L da hemolinfa foram coletados e ressuspensos por pipetagem em um dos poços da placa contendo 50 μ L do tampão CCLR, esta ordem do procedimento é essencial pois a hemolinfa da lagarta exposta ao ar rapidamente

coagula, e o tampão CCLR impede esta ocorrência. De acordo com Eni *et al.* (2010), 5 μ L de hemolinfa de larvas *Anticarsia* infectadas no quarto ínstar contêm cerca de 75 mil células.

Em cada poço foram adicionados 10 μ L de Luciferina, em um dos poços controle foram adicionados apenas CCLR e 10 μ L de Luciferina. A placa foi submetida a leitura de luminescência pelo espectrofotômetro e luminômetro SpectraMax M5 (Molecular Devices), com parâmetros definidos para leitura de luminescência, espectro total de luz visível, leitura superior e tempo de integração 1500 ms. O valor do branco é considerado o controle de atividade endógena, e é reduzido dos valores das amostras experimentais. A medição de hemolinfa deve ser feita no SpectraMax M5 pois este luminômetro não possui limite superior de detecção de fótons, e constantemente é encontrado um intenso sinal de luminescência derivada da infecção da hemolinfa.

3.8.2. Visualização e fotodocumentação de larvas *Anticarsia gemmatalis* infectadas por injeção intrahemocélica.

Com o objetivo de observar a luminescência total derivada da infecção pelos baculovírus AgMNPV recombinantes, em contraste a medir uma parcela da hemolinfa, foi desenvolvida uma simples metodologia de indução da luminescência no corpo das larvas, pela injeção de Luciferina na hemolinfa, e fotodocumentação em sala escura utilizando uma câmera de alta definição e longo tempo de exposição. Trabalhos anteriores com baculovírus AcMNPV recombinante demonstraram que ocorre uma produção intensa de luciferase durante a infecção da larva, que pode totalizar mais do que 25% do total de proteína do corpo da larva, o suficiente para ser vista a olho nú, dependendo do promotor utilizado e quantidade de luciferina aplicada (Jha *et al.*, 1990; Hasnain, 1990).

Neste ensaio, foram avaliados os AgMNPVs contendo os promotores ie1, gp64, polh, p10, p6.9 e vp39. As larvas foram infectadas pela metodologia descrita na seção anterior (3.8.1). Brevemente, a injeção é feita no segundo par de patas, 50 µL de inóculo em cada larva (5×10^5 PFU). A cada dia pós-infecção, uma lagarta com sinal positivo de luciferase derivada da infecção de cada um dos vírus mencionados foi submetida à indução de luminescência pela injeção de 100 µL de Luciferina pelo terceiro par de patas. Após a injeção, as lagartas foram mantidas a temperatura ambiente por 5 minutos para que ocorra a cicatrização do local perfurado e dispersão de Luciferina pela hemolinfa.

As fotografias foram tiradas em uma sala com escuro total. As lagartas foram colocadas sobre papel toalha e dispostas na mesma orientação. Uma câmera Nikon D90, com uma lente Nikon 50/135, foi acoplada a uma armação suspensa a 70 cm de altura em relação a área a ser fotografada. A câmera deve estar no modo manual de execução, com os parâmetros ISO 200, f1/4, o tempo de exposição para fotografia em campo claro de 100 ms e para a fotografia em campo escuro 15 s.

O foco e zoom foram ajustados manualmente em campo claro. A foto em campo claro foi tirada, e imediatamente depois o tempo de exposição foi alterado para 15 s com cuidado para não mover a câmera, as luzes foram apagadas e então foi retirada a foto de longa exposição.

3.9. Análise *in silico* das sequências dos promotores

Para analisar as sequências dos promotores, foi utilizado o software Geneious 4.8.2 (Biomatters). As sequências dos promotores AgMNPV foram derivadas do genoma da linhagem AgMNPV-2D (Oliveira *et al.*, 2006), identificador de acesso no GenBank: NC_008520.

A análise consiste de realizar uma busca BlastN, utilizando o software Geneious, utilizando a sequência completa de cada promotor isolado, dentro da database de cromossomos (que inclui as publicações de genomas completos e exclui sequenciamentos de fragmentos de genomas), com filtro de baixa complexidade e filtro de repetições de sequências humanas ativados, *word size* 11 e *max E value* 10.

Os *hits* obtidos pela busca foram filtrados manualmente, buscando manter apenas os que correspondem a sequências derivadas de genomas completos de baculovírus. As sequências foram realinhadas, utilizando o alinhamento embutido no programa Geneious, com parâmetros 70% de similaridade (IUB), no modo alinhamento global com extremidades livres, *gap open penalty* 12 e *gap extension penalty* 3.

A partir deste alinhamento, a sequência do promotor de AgMNPV foi anotada com os elementos descritos na literatura e presentes nas sequências em questão.

O software Geneious também foi utilizado para desenhar os mapas dos plasmídeos encontrados neste trabalho.

4. RESULTADOS

4.1. Amplificação dos promotores virais e clonagem no vetor de transferência p2100FLUC

A estratégia de clonagem utilizada neste trabalho para a construção dos plasmídeos de transferência para recombinação em células de inseto, possui duas partes, primeiro foram construídos os plasmídeos p2100GP64FLUC e p2100IE1FLUC, por clonagem direta em extremidades abruptas dos insertos GP64FLUC e IE1FLUC no sítio único *EcoRV*, dentro do plasmídeo de transferência p2100. Estes plasmídeos foram confirmados por reações com enzimas de restrição *EcoRV* e *SspI*.

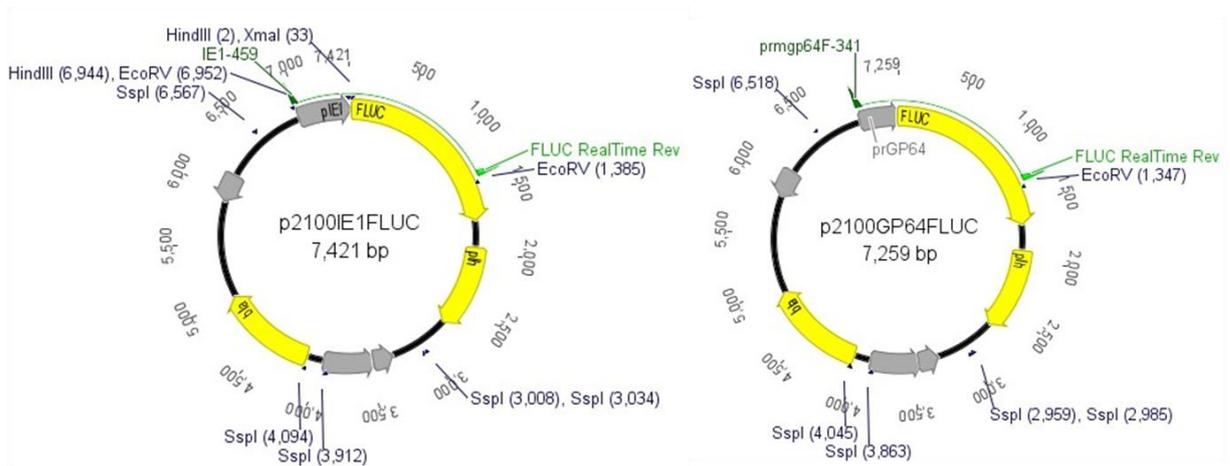


Figura 6: Mapa vetor dos plasmídeos de transferência por recombinação homóloga construídos p2100GP64FLUC e p2100IE1FLUC. Os sítios de clivagem de enzimas de restrição realçadas *SspI* e *EcoRV* foram utilizados para confirmação dos plasmídeos. Os sítios *HindIII* e *XmaI* no plasmídeo p2100IE1FLUC formam o alvo de clonagem dos demais promotores.

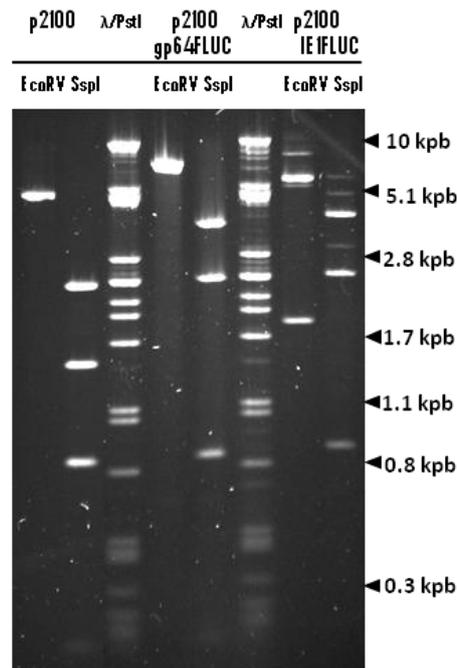


Figura 7: Gel de agarose 0,8% contendo digestões dos plasmídeos p2100, p2100GP64FLUC e p2100IE1FLUC com as enzimas *EcoRV* e *SspI*. A digestão do plasmídeo p2100 serve como controle negativo em relação aos plasmídeos p2100GP64FLUC e p2100IE1FLUC. A enzima *EcoRV* lineariza os plasmídeos, enquanto que a enzima *SspI* realiza diversos cortes, permitindo distinguir entre os diferentes plasmídeos.

Após esta clonagem, notou-se a presença de sítios *HindIII* e *XmaI* que permitiriam a retirada do promotor *ie1* e a clonagem direcional de insertos a montante do gene FLUC, no plasmídeo p2100IE1FLUC.

Oligonucleotídeos foram construídos para amplificar os promotores, p6.9 (483 pb), *hel* (486 pb), p10 (351 pb), *polh* (421 pb) e *vp39* (290 pb) a partir do genoma do baculovírus AgMNPV e o promotor CMVie1 (801 pb) a partir do plasmídeo pRLCMV (Promega).

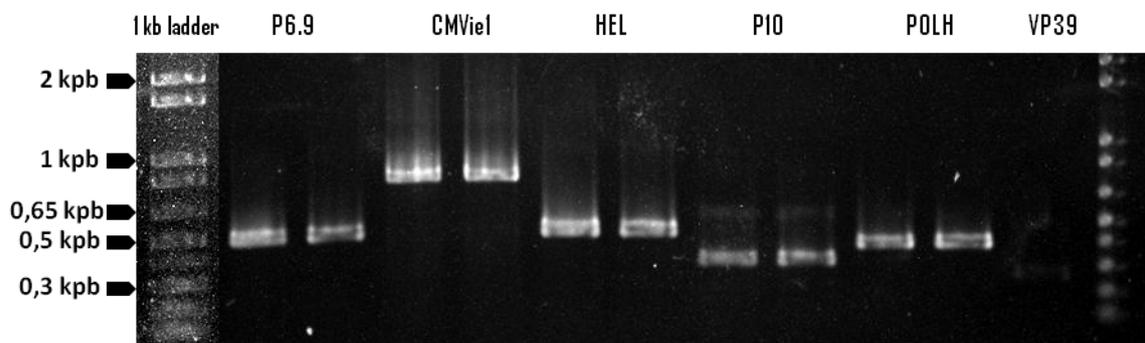


Figura 8: Gel de agarose 0,8% contendo o resultado das reações de PCR que isolaram os promotores virais p6.9, CMVie1, *hel*, p10, *polh* e *vp39*.

Os *primers* foram desenhados para conter sítios das enzimas *HindIII* na extremidade 5' e *XmaI* na extremidade 3' dos amplicons, o que permitiu a digestão dos insertos de PCR purificados e clonagem no plasmídeo p2100IE1FLUC, assim gerando os plasmídeos de transferência p2100VP39FLUC, p2100HELFLUC, p2100P69FLUC, p2100POLHFLUC, p2100P10FLUC e p2100CMVFLUC, conforme mapas das figuras 9 e 10. Todos os plasmídeos de transferência construídos foram verificados por digestões planejadas individualmente para cada, buscando clivagens internas aos promotores.

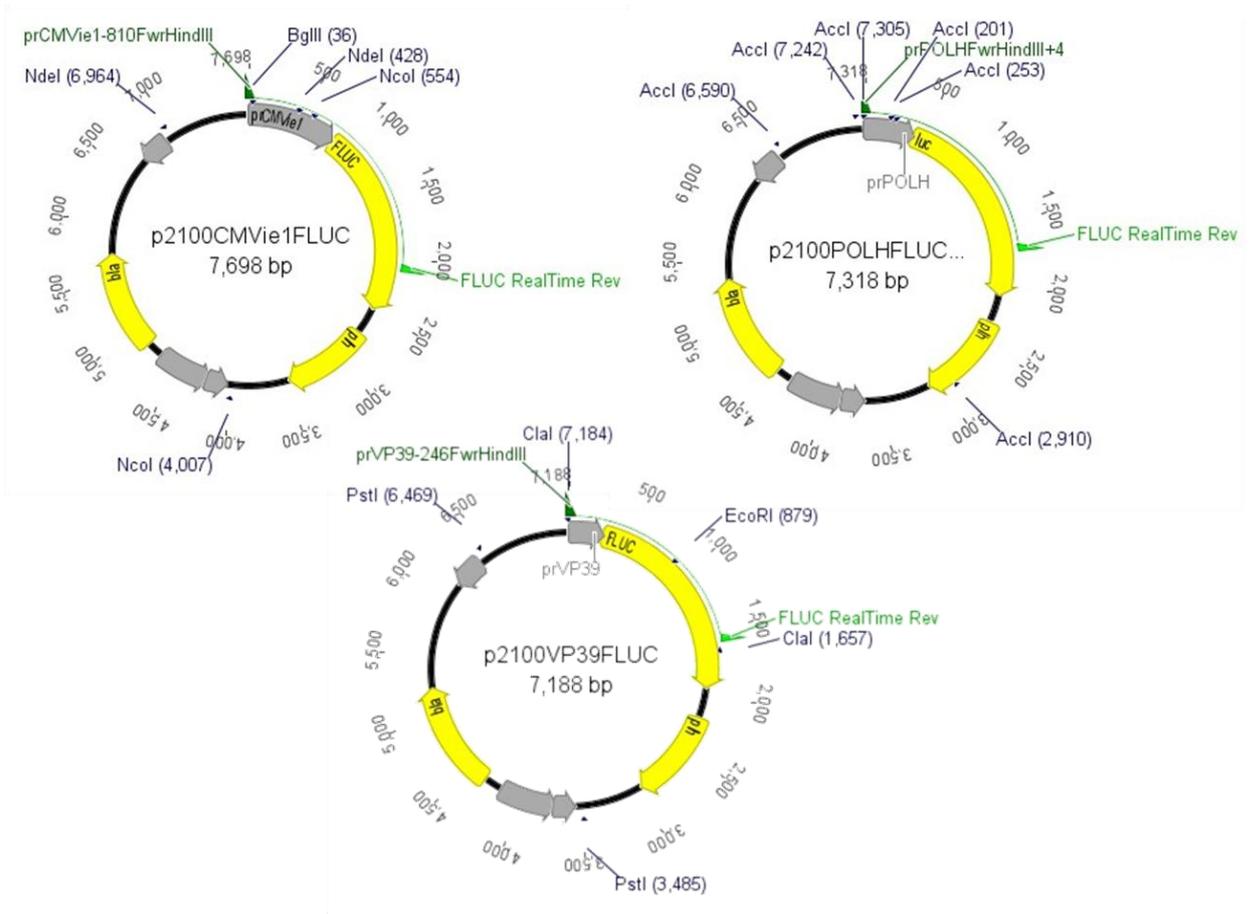
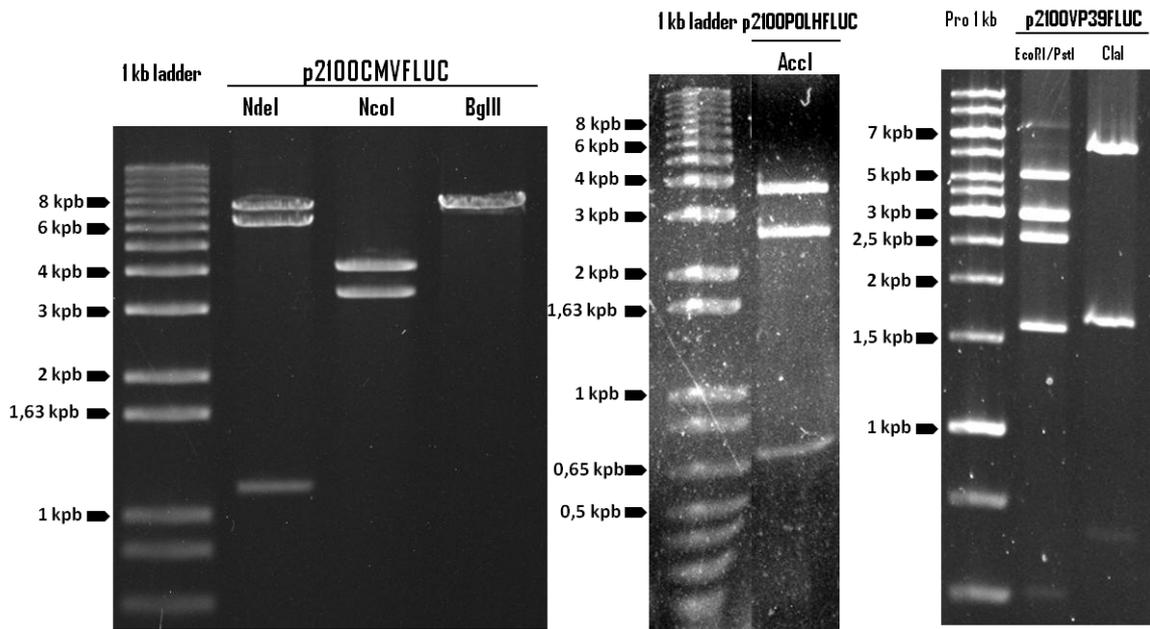


Figura 9: Géis de agarose (0,8%) contendo as digestões dos plasmídeos p2100CMVFLUC, p2100POLHFLUC e p2100VP39FLUC. Cada plasmídeo exigiu uma digestão distinta, buscando clivar dentro da sequência de cada promotor. Mapas dos plasmídeos respectivos às digestões, contendo as enzimas utilizadas e a posição de cada sítio de restrição, também realçado em verde a posição de anelamento dos oligonucleotídeos utilizados para confirmar a presença dos insertos no genoma dos baculovírus AgMNPV recombinantes.

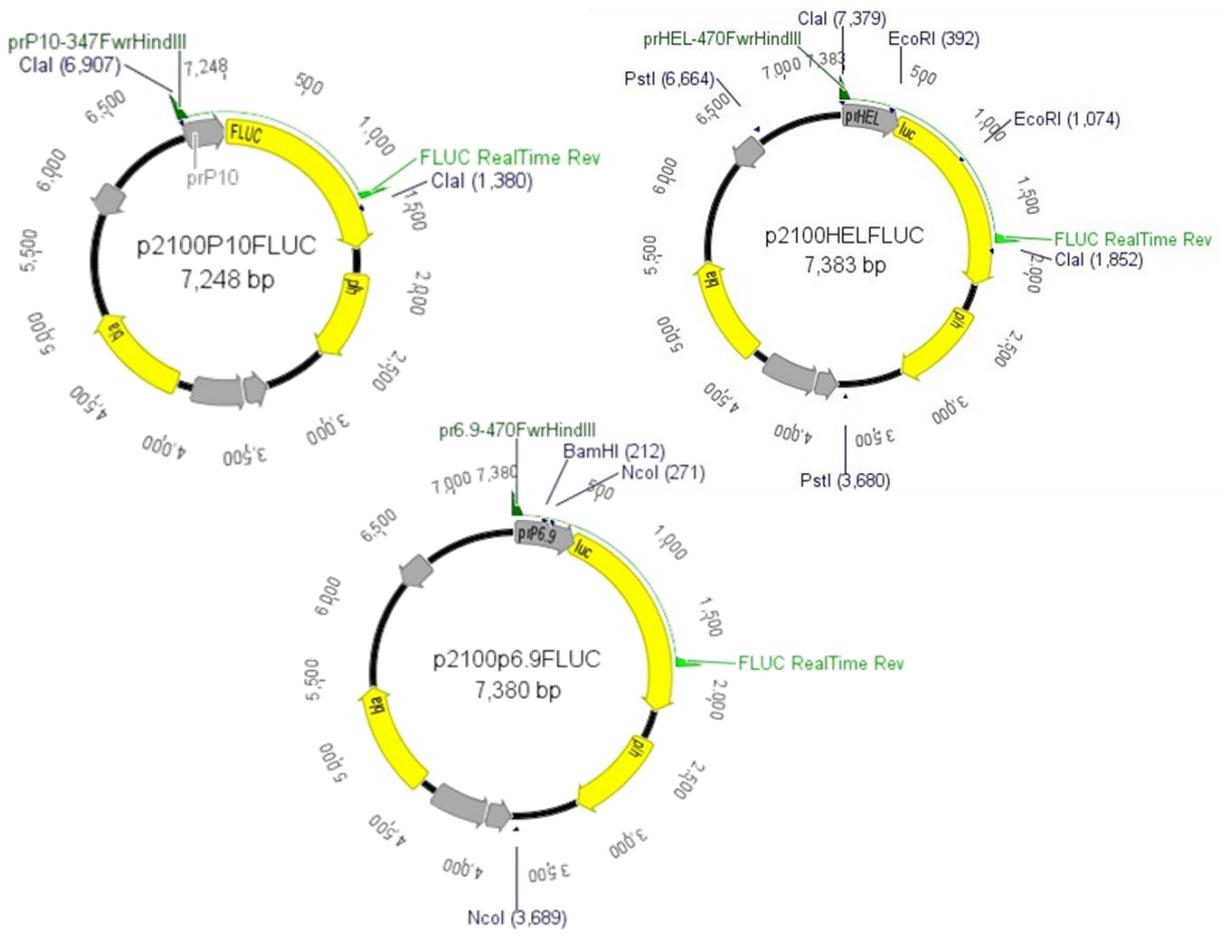
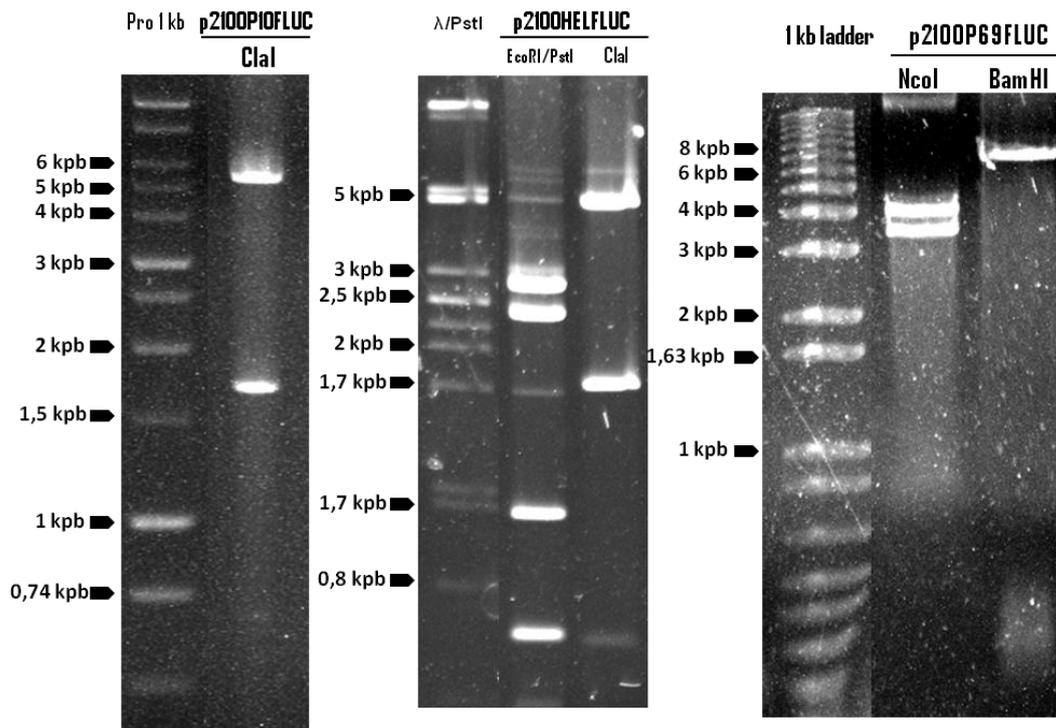


Figura 10: Géis de agarose (0,8%) contendo as digestões dos plasmídeos p2100P10FLUC, p2100HELFLUC e p2100P69FLUC. Cada plasmídeo exigiu uma digestão distinta, buscando clivar dentro da sequência de cada promotor. Mapas dos plasmídeos respectivos às digestões, contendo as enzimas utilizadas e a posição de cada sítio de restrição, também realçado em verde a posição de anelamento dos oligonucleotídeos utilizados para confirmar a presença dos insertos no genoma dos baculovírus AgMNPV recombinantes.

4.2. Geração e purificação dos baculovírus AgMNPV recombinantes

Os baculovírus AgMNPV recombinantes foram gerados pela cotransfecção, em células de inseto UFL-AG-286, de cada um dos plasmídeos de transferência com o DNA viral purificado do baculovírus AgMNPV recombinante vAgGAL. Este último possui o gene *beta-galactosidase* (*lac-Z*) de *E. coli* no *locus* do gene *polh*, tornando este vírus incapaz de produzir OBs (Ribeiro *et al.*, 2001). Com a recombinação entre os plasmídeos de transferência e o *locus* do gene *polh* no genoma do vírus vAgGAL, o gene *beta-gal* é substituído pelo construto promotor-FLUC e resgata o gene *polh* (ver Figura 11), o que gera um recombinante que produz luciferase, portanto é passível de detecção por luminometria, e também gera OBs que podem ser observados em momentos muito tardios da infecção de células UFL-AG-286 ou BTI-Tn-5B1-4 por microscopia. Depois de purificados, cada um dos recombinantes foi confirmado por reação de PCR utilizando *primers* específicos ao promotor e o gene FLUC.

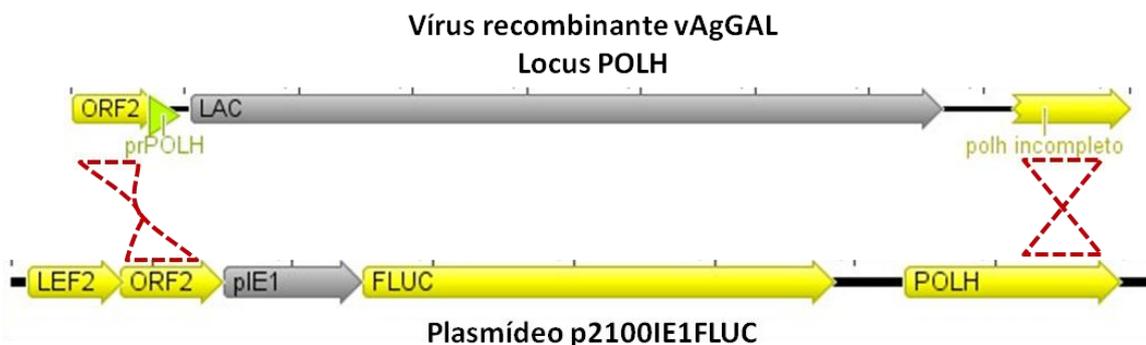


Figura 11: Esquema da recombinação entre o *locus polh* do baculovírus recombinante oclusão negativa vAgGAL contendo o gene *beta-gal* (LAC), notar que o gene *polh* está incompleto, faltando o códon ATG de iniciação, e o fragmento do plasmídeo p2100IE1FLUC que corresponde ao *locus polh*, contendo o promotor IE1 (pIE1) a montante do gene FLUC. Em vermelho as regiões que irão recombinar entre si, transferindo o fragmento delimitado do plasmídeo p2100IE1FLUC para o *locus polh* no genoma do vírus vAgGAL, que então se tornará um vírus oclusão positivo e luciferase positivo, vAgIE1FLUC.

O vírus recombinante contido no inóculo viral a partir da cotransfecção foi purificado pela metodologia *end-point dilution*, que envolve o preparo de placas de 96 poços contendo células de inseto infectadas por diluições seriadas do inóculo viral. Os poços de máxima diluição e com os dois fenótipos desejados, luminescência e formação

de poliedros no núcleo de células infectadas, foram coletados e diluídos novamente. Este procedimento foi repetido pelo menos 4 vezes, o que resultou na gradual purificação do inóculo viral que continha o vírus vAgGAL e uma pequena parcela do AgMNPV recombinante contendo o gene de interesse, para um inóculo contendo quase que exclusivamente o AgMNPV recombinante com os fenótipos desejados.

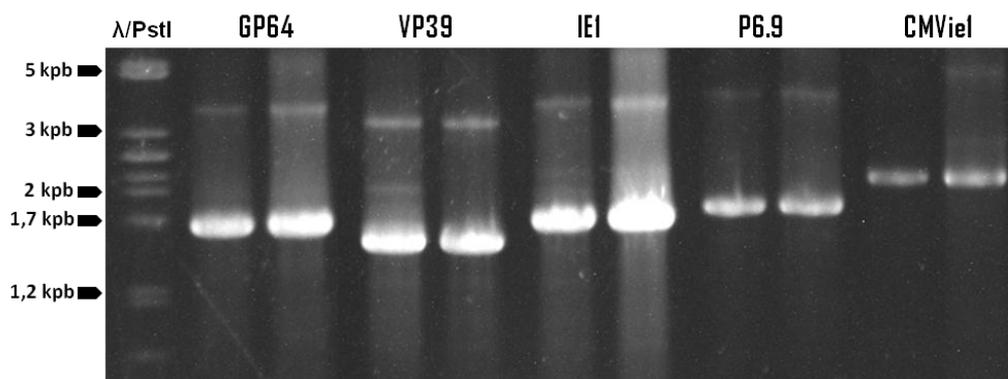


Figura 12: Gel de agarose 0,8% contendo o resultado de reações de PCR utilizando *primers* de cada promotor e um *primer* que anela no gene FLUC. O DNA molde utilizado em cada reação é derivado da purificação de DNA viral dos recombinantes vAgGP64FLUC (tamanho esperado: 1635 pb), vAgVP39FLUC (1578 pb), vAgIE1FLUC (1786 pb), vAgP69FLUC (1770 pb) e vAgCMVFLUC (2100 pb). Os fragmentos amplificados confirmam a presença dos promotores a montante do gene FLUC em cada recombinante, as figuras 6, 9 e 10 mostram as posições de anelamento dos *primers* nos plasmídeos e conseqüentemente nos vírus resultantes.

Os baculovírus vAgP10FLUCv2 e vAgHELFLUC (construídos utilizando os plasmídeos p2100P10FLUC e p2100HELFLUC, respectivamente, cuja construção foi relatada acima) foram difíceis de purificar completamente, devido a baixa atividade destes promotores, o que dificultou a detecção dos recombinantes contendo ambos fenótipos desejados: luminescência e produção de OBs. Após purificados, estes inóculos virais não foram confirmados por PCR e portanto não foram utilizados nos ensaios. Desta forma, o baculovírus vAgP10FLUC utilizado nos ensaios foi construído por Neves *et al.* (2005), que possui o promotor p10 regulando o gene FLUC, mas clonados no *locus* do gene *p10*, ao invés do *locus* da poliedrina, como feito para os demais.

4.3. Detecção da atividade de luciferase em células de inseto infectadas com os AgMNPV recombinantes

4.3.1. Ensaio de medição por lise

Os ensaios de infecção de células UFL-AG-286 com os baculovírus recombinantes vAgIE1FLUC, vAgGP64FLUC, vAgVP39FLUC, vAgP69FLUC, vAgPOLHFLUC e vAgP10FLUC, tinham como objetivo a confirmação da atividade temporal dos promotores contidos nos baculovírus recombinantes construídos, avaliar os limites inferiores e superiores de luminescência produzida durante a infecção de cada recombinante e avaliar o erro experimental com base no desvio das replicatas biológicas em relação a média.

Os promotores ie1 e gp64 de AgMNPV apresentaram um padrão de expressão na fase precoce, a partir da terceira hora da infecção, já com um sinal relativamente alto, o que implica em início de expressão entre a primeira e terceira hora de infecção, com crescimento linear e estável ao longo da infecção (Gráfico 1). Os promotores vp39 e p6.9 apresentaram um padrão de expressão de promotores da fase tardia, primeiramente detectados as 6 h p.i. e com um aumento intenso entre 9 e 12 h p.i., aumento de 1000 vezes para o promotor p6.9 e 100 vezes para o promotor vp39 no intervalo temporal citado. O promotor polh apresentou um perfil de expressão tardio, devido à detecção as 9 h p.i., com aumento de 10 vezes no valor de luminescência a cada 3 h de infecção. O promotor p10 foi detectado a partir das 15 h p.i., com rápido crescimento até as 36 h p.i.. A hiperexpressão dos promotores muito tardios polh e p10 só superou os valores dos promotores VP39 e P6.9, após 48 h p.i. (dados não mostrados).

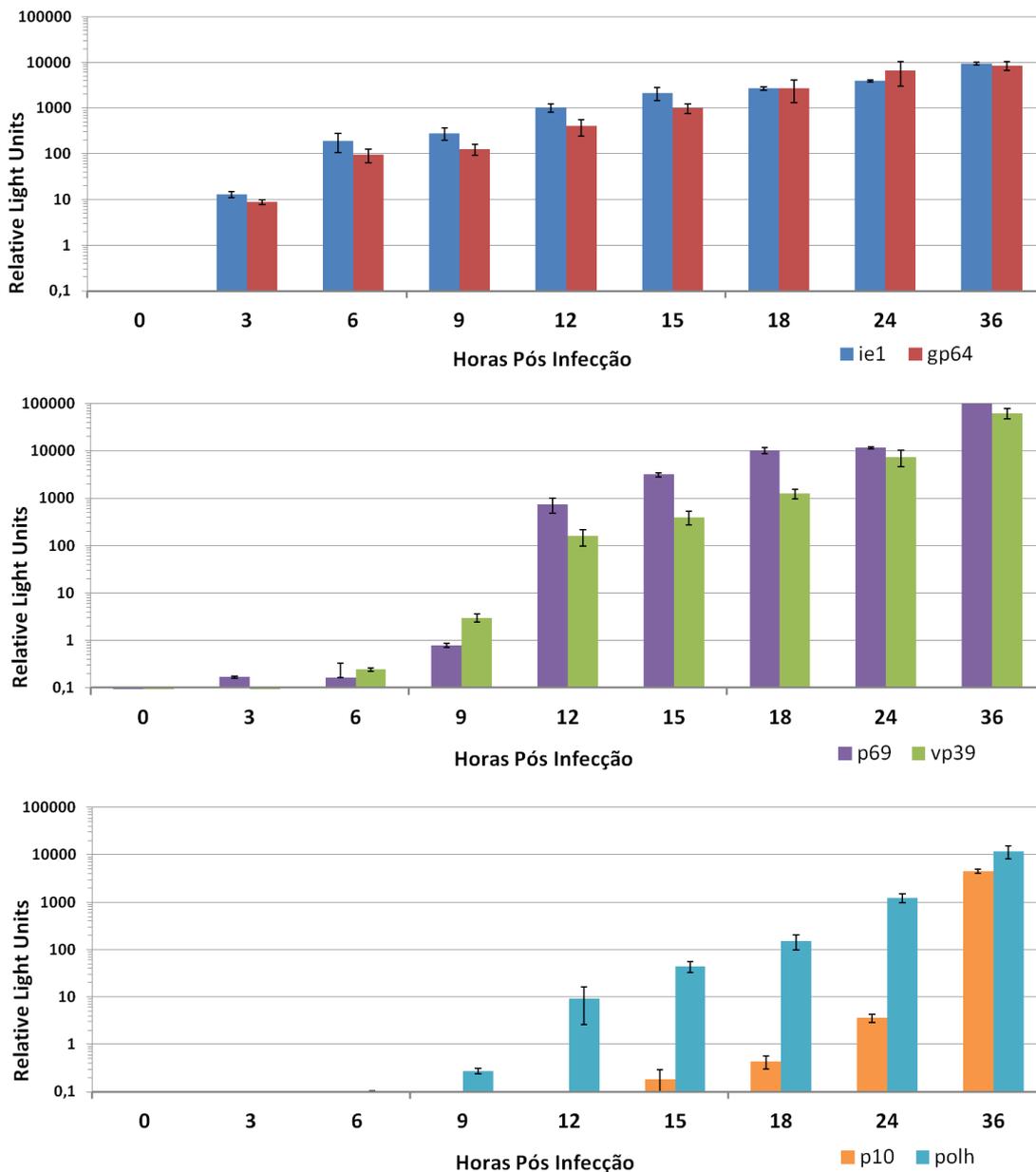


Gráfico 1: Histogramas contendo os resultados dos ensaios de medição por lise das infecções dos vAgMNPV recombinantes vAgIE1FLUC, vAgGP64FLUC, vAgP69FLUC, vAgVP39FLUC, vAgPOLHFLUC e vAgP10FLUC em células UFL-AG-286. As barras representam o valor da média das triplicatas e as barras de erro representam o desvio padrão em relação a média. Os gráficos estão organizados com base nos grupos de expressão, a expressão imediatamente precoce dos promotores ie1 e gp64, expressão tardia dos promotores p6.9 e vp39 e a expressão muito tardia dos promotores p10 e polh. Normalização com base no número de células.

4.3.2. Ensaios de medição contínua

Os ensaios de medição contínua permitem um número maior de amostras biológicas a serem avaliadas, portanto este ensaio foi realizado utilizando as diversas células de inseto disponíveis, nominalmente UFL-AG-286, IPLB-SF21-AE, BTI-Tn-

5B1-4, IPLB-Ld652Y e C636. Cada uma das linhagens celulares foi infectada individualmente com o inóculo dos vírus vAgIE1FLUC, vAgGP64FLUC, vAgVP39FLUC, vAgP69FLUC, vAgPOLHFLUC e vAgP10FLUC. Além destes vírus com promotores do baculovírus AgMNPV, também foi utilizado o inóculo viral contendo o baculovírus vAgCMVFLUC, para avaliar se ocorre e quando ocorre a atividade transcricional a partir deste promotor de vírus de mamífero em células de inseto. Todas infecções ocorreram com MOI 1, o que representa uma infecção síncrona de todas as células por apenas uma partícula viral.

A linhagem celular BM5 não apresentou nenhum sinal de luminescência com qualquer um dos AgMNPV recombinantes construídos, em nenhum momento após a infecção.

As linhagens UFL-AG-286 e BTI-Tn-5B1-4 foram permissivas ao baculovírus AgMNPV, enquanto que a linhagem IPLB-SF21-AE é considerada semipermissiva devido a baixa replicação viral, resultante da infecção por AgMNPV, em comparação às linhagens permissivas (Gráfico 2). Estas 3 linhagens apresentaram um padrão de expressão gênica muito similar, a maior diferença está nos níveis de luminescência, que em BTI-Tn-5B1-4 e IPLB-SF21-AE foram 2 vezes maiores que na linhagem UFL-AG-286. Em IPLB-SF21-AE a expressão do promotor GP64 teve um atraso e *downregulation* em relação às linhagens BTI-Tn-5B1-4 e UFL-AG-286, o sinal de luminescência só foi detectado a partir de 3 h p.i. enquanto que em UFL-AG-286 e BTI-Tn-5B1-4 o sinal do promotor gp64 é detectado entre 1 e 2 h p.i..

O promotor vp39 apresentou um padrão de expressão de gene precoce, ou precoce atrasado (*delayed early*), com início da expressão a 5 h p.i. em UFL-AG-286, 3 h p.i. em BTI-Tn-5B1-4 e IPLB-SF21-AE. Entre os promotores de fase precoce, este é o mais forte, cujo pico de expressão é comparável ao promotor polh, no entanto, o

promotor vp39 induz uma rápida expressão que atinge o nível máximo as 30 h p.i., enquanto que o promotor polh atinge o pico de expressão após 50 h p.i..

A infecção da linhagem IPLB-LD652Y pelo baculovírus AgMNPV (Gráfico 3) nunca foi avaliada e os resultados do ensaio de medição contínua demonstram níveis baixos de expressão de todos promotores, pelo menos 10 vezes menor que nas células permissíveis, além de um atraso na expressão dos promotores dos genes *ie1* e *gp64*, que só foram detectados a partir de 4 h p.i.. Ocorre uma aparente *downregulation* da atividade dos promotores de genes muito tardios como polh e p10, além disto, nota-se que os níveis de luminescência dos promotores vp39 e p6.9 não foram maiores que os níveis de gp64 e ie1, todos estes estabilizando próximos ao valor 100 RLU. O promotor p10 não foi capaz de gerar luminescência suficiente para ser detectada ao longo da infecção.

A infecção da linhagem C636, derivada de mosquito, também nunca avaliada em termos da infectividade do AgMNPV, apresentou um perfil de expressão gênica similar à linhagem IPLB-LD652Y (Gráfico 3), com baixos níveis de luminescência, pelo menos 10 vezes menor que nas linhagens permissivas, atraso na expressão a partir de promotores precoces (só surgem a partir de 4 h p.i.) e uma *downregulation* ainda maior da atividade dos promotores de genes tardios, como o promotor p6.9, que possui forte atividade nas demais linhagens derivadas de organismos da ordem Lepidoptera. Além disto, não foi detectado nenhuma luminescência derivada do promotor polh e p10, o que indica que a fase muito tardia da infecção não ocorre em C636.

O promotor CMVie1 foi capaz de induzir a expressão de luciferase em todas linhagens, salvo BM5, e o perfil de expressão foi muito similar entre as linhagens permissivas e semipermissiva, UFL-AG-286, BTI-Tn-5B1-4 e IPLB-SF21-AE, com início de expressão ao fim de 4 h p.i. e um aumento lento até o nível máximo de

expressão, que foi muito menor que os demais promotores, em UFL-AG-286 pelo menos 10 vezes menor que os promotores ie1 e gp64, salvo o promotor p10. Nas linhagens não permissivas, IPLB-LD652Y e C636, o sinal de luminescência a partir deste promotor heterólogo só surge a partir de 6 h p.i. e o sinal de luminescência é pelo menos 50 vezes mais fraco que os demais. O promotor CMVie1 durante a infecção de baculovírus em células de inseto funcionou como um promotor precoce e fraco.

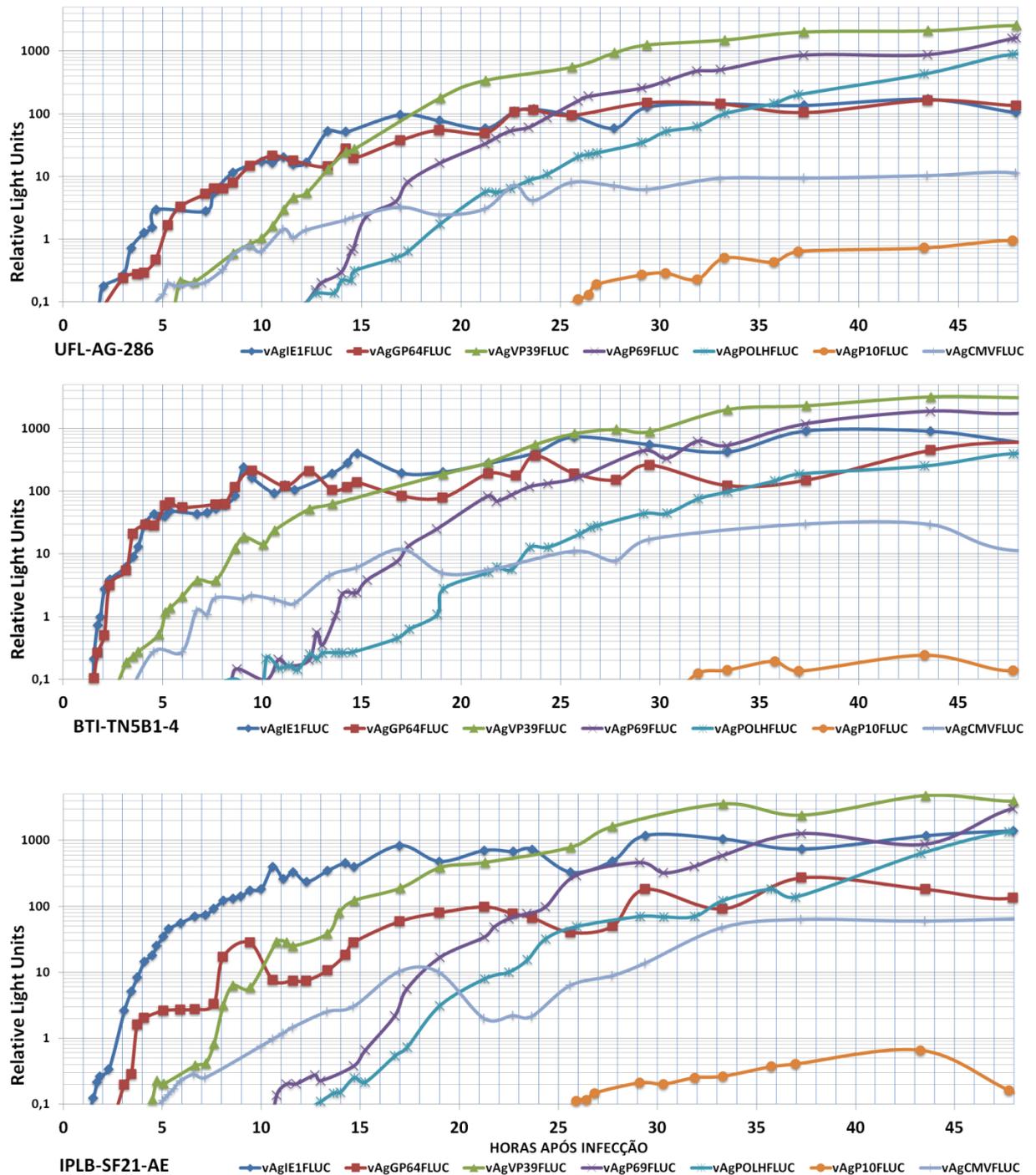


Gráfico 2: Séries temporais derivadas dos ensaios de medição contínua da infecção dos baculovírus recombinantes nas linhagens permissivas UFL-AG-286, BTI-Tn5B1-4 e IPLB-SF21-AE. As figuras representam experimentos típicos em que cada curva relata o progresso da expressão de luciferase em uma população de 500 mil células com cada um dos baculovírus recombinantes construídos.

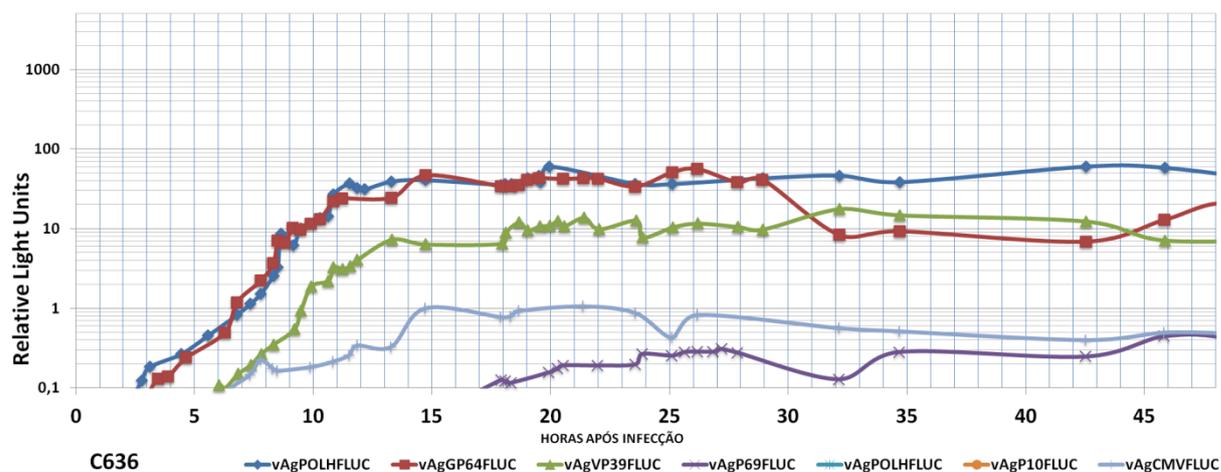
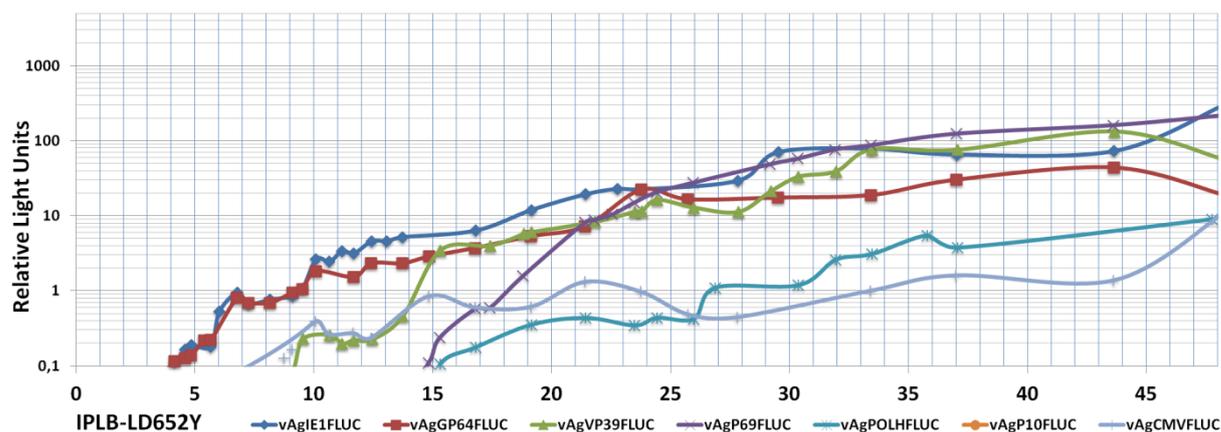


Gráfico 3: Séries temporais derivadas dos ensaios de medição contínua da infecção dos baculovírus recombinantes nas linhagens não permissivas IPLB-LD652Y e C636. As figuras representam experimentos típicos em que cada curva representa o progresso da expressão de luciferase em uma população de 500 mil células com cada um dos baculovírus recombinantes construídos.

Para facilitar a comparação com outros trabalhos, é possível resumir os resultados dos ensaios de medição contínua em termos de: tempo de início (T_{in}), que é o primeiro momento em que o sinal de luminescência foi detectado (acima de 0,100 RLU), tempo até o máximo (T_{max}) que é o tempo que o valor de luminescência demora para atingir o máximo e estabilizar o sinal, desde o tempo 0 da infecção, e o valor máximo de luminescência atingido (V_{max}). A Tabela 2 contém estas informações.

Tabela 2: Resumo dos resultados de medição contínua de luciferase durante a infecção com os baculovírus AgMNPV recombinantes em diferentes linhagens celulares de inseto. Tin: tempo de início da expressão, Tmax: tempo em que a expressão atinge o valor máximo e estabiliza, Vmax: valor máximo de luminescência, em RLU, atingido durante a infecção.

Vírus	Célula	Tin	Tmax	Vmax
vAgIE1FLUC	UFLAg	2:00:00	17:00:00	100
	Tn5B	1:30:00	9:00:00	200
	Sf21	1:30:00	23:00:00	1000
	LD652Y	4:00:00	30:00:00	70
	C636	3:00:00	12:00:00	40
	Bm5	-	-	-
vAgGP64FLUC	UFLAg	3:00:00	17:00:00	100
	Tn5B	1:30:00	9:00:00	200
	Sf21	3:00:00	51:00:00	430
	LD652Y	4:00:00	43:00:00	43
	C636	3:30:00	26:00:00	36
	Bm5	-	-	-
vAgVP39FLUC	UFLAg	6:00:00	48:00:00	2000
	Tn5B	5:30:00	43:00:00	3000
	Sf21	6:00:00	60:00:00	3000
	LD652Y	9:30:00	60:00:00	600
	C636	6:00:00	20:00:00	10
	Bm5	-	-	-
vAgP69FLUC	UFLAg	12:00:00	51:00:00	2500
	Tn5B	7:00:00	68:00:00	3300
	Sf21	12:00:00	60:00:00	4500
	LD652Y	15:00:00	57:00:00	300
	C636	15:00:00	45:00:00	0,4
	Bm5	-	-	-
vAgPOLHFLUC	UFLAg	12:00:00	80:00:00	2700
	Tn5B	10:00:00	75:00:00	3000
	Sf21	13:00:00	80:00:00	3000
	LD652Y	15:00:00	75:00:00	21
	C636	-	-	-
	Bm5	-	-	-
vAgP10FLUC	UFLAg	26:00:00	68:00:00	5
	Tn5B	32:00:00	51:00:00	0,3
	Sf21	25:00:00	43:00:00	0,6
	LD652Y	-	-	-
	C636	-	-	-
	Bm5	-	-	-

4.4. Detecção da atividade de luciferase em larvas de inseto infectadas com os AgMNPV recombinantes

4.4.1. Ensaios de infecção por injeção intrahemocélica

A injeção intrahemocélica é a metodologia de infecção de larvas mais utilizada quando estas são utilizadas como bioreatores na produção de proteínas heterólogas pelo sistema de expressão baculovírus. Este ensaio buscou avaliar a atividade dos promotores de AgMNPV durante a infecção por via intrahemocélica das larvas *Anticarsia gemmatalis*, e desta forma definir qual promotor é o mais eficiente na produção de proteínas heterólogas neste método de expressão. Outro ponto de interesse foi a avaliação da atividade dos promotores fortes durante a infecção de larvas *Spodoptera frugiperda*. Os baculovírus AgMNPV recombinantes utilizados contém apenas promotores derivados do AgMNPV, excluindo então o vírus vAgCMVFLUC deste ensaio.

Durante as primeiras 24 h p.i., os promotores vp39 e p6.9 foram os mais produtivos enquanto que o promotor p10 é o mais fraco (Gráfico 4). Após 48 h p.i., o promotor dominante é o promotor polh, que chega a elicitar luminescência na faixa de milhões de unidades luminosas. Considerando que a medição executada envolve uma pequena fração da hemolinfa da larva, 5 µL, estes valores derivados do promotor polh são extremamente altos.

Os promotores ie1 e gp64 induziram uma expressão modesta de luminescência ao longo do ensaio com crescimento gradual, até atingirem a faixa dos milhares de unidades luminosas, sempre inferior aos demais promotores (salvo p10), o promotor ie1 produzindo 100 vezes menos luminescência que o promotor polh a 122 h p.i..

O promotor p10 aparentemente não é capaz de induzir hiperexpressão nas larvas pois não ocorre o aumento da intensidade de luminescência ao longo do tempo, a maior

expressão detectada apresentou valor 100 RLU a 48 h p.i., o que corresponde à 10000 vezes menos luminescência que a induzida pelo promotor polh a 122 h p.i.

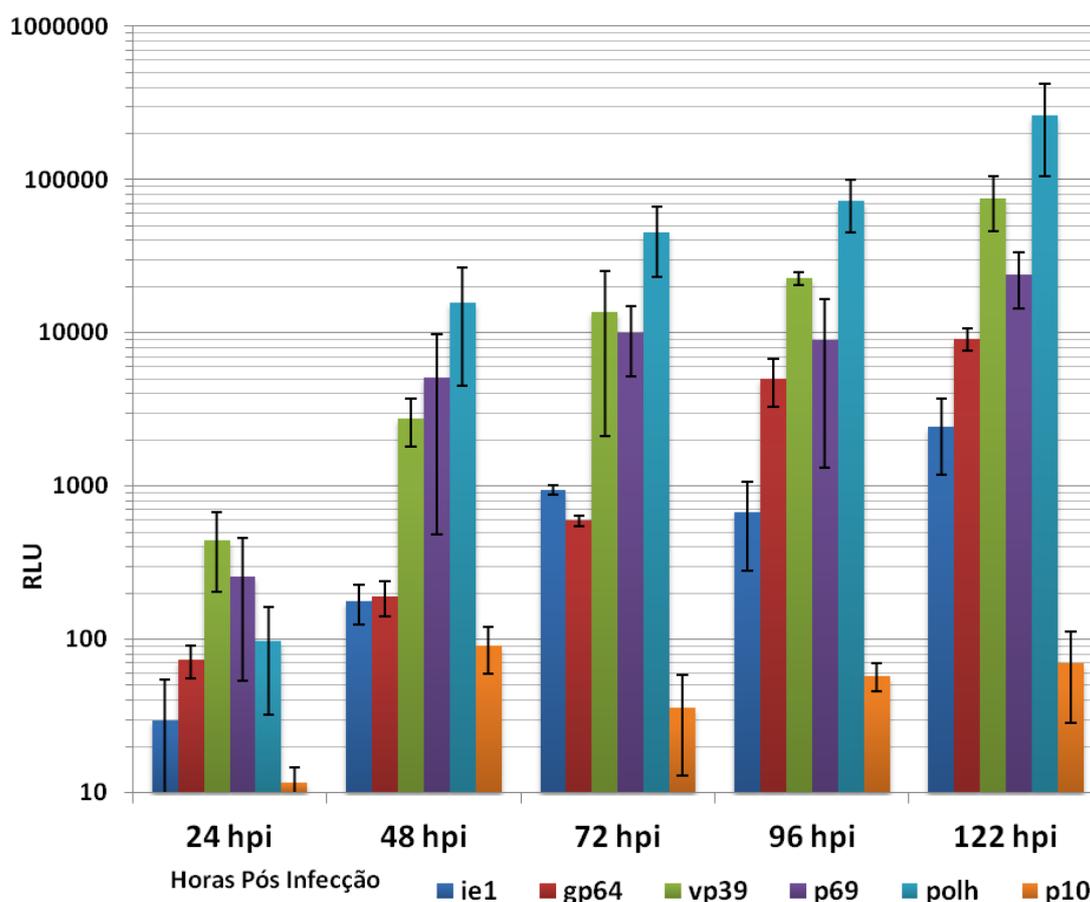


Gráfico 4: Histograma contendo os resultados dos ensaios de medição de hemolinfa de larvas *Anticarsia gemmatilis* infectadas por via intrahemocélica com os baculovírus recombinantes vAgIE1FLUC, vAgGP64FLUC, vAgVP39FLUC, vAgP69FLUC, vAgPOLHFLUC e vAgP10FLUC. O eixo vertical inicia a partir de 10 RLU, valor considerado como limite de corte para excluir sinais falsos de luminescência. As barras representam o valor da média das triplicatas e as barras de erro representam o desvio padrão em relação a média. Sem normalização.

Uma forma alternativa de avaliar a produtividade total de FLUC no corpo da larva, em contraste às medições de uma pequena fração, foi injetar luciferina nas larvas e realizar fotografias de alta definição em sala escura (Figura 13), o que resulta em uma observação da luminescência total no corpo da larva.

As fotografias correlacionam bem com os valores de luminescência da hemolinfa, sendo que o promotor polh claramente é o mais produtivo, seguido pelo promotores vp39 e p6.9. A luminescência induzida pelos promotores ie1, gp64 e p10 não foi suficiente para detecção por fotografia.

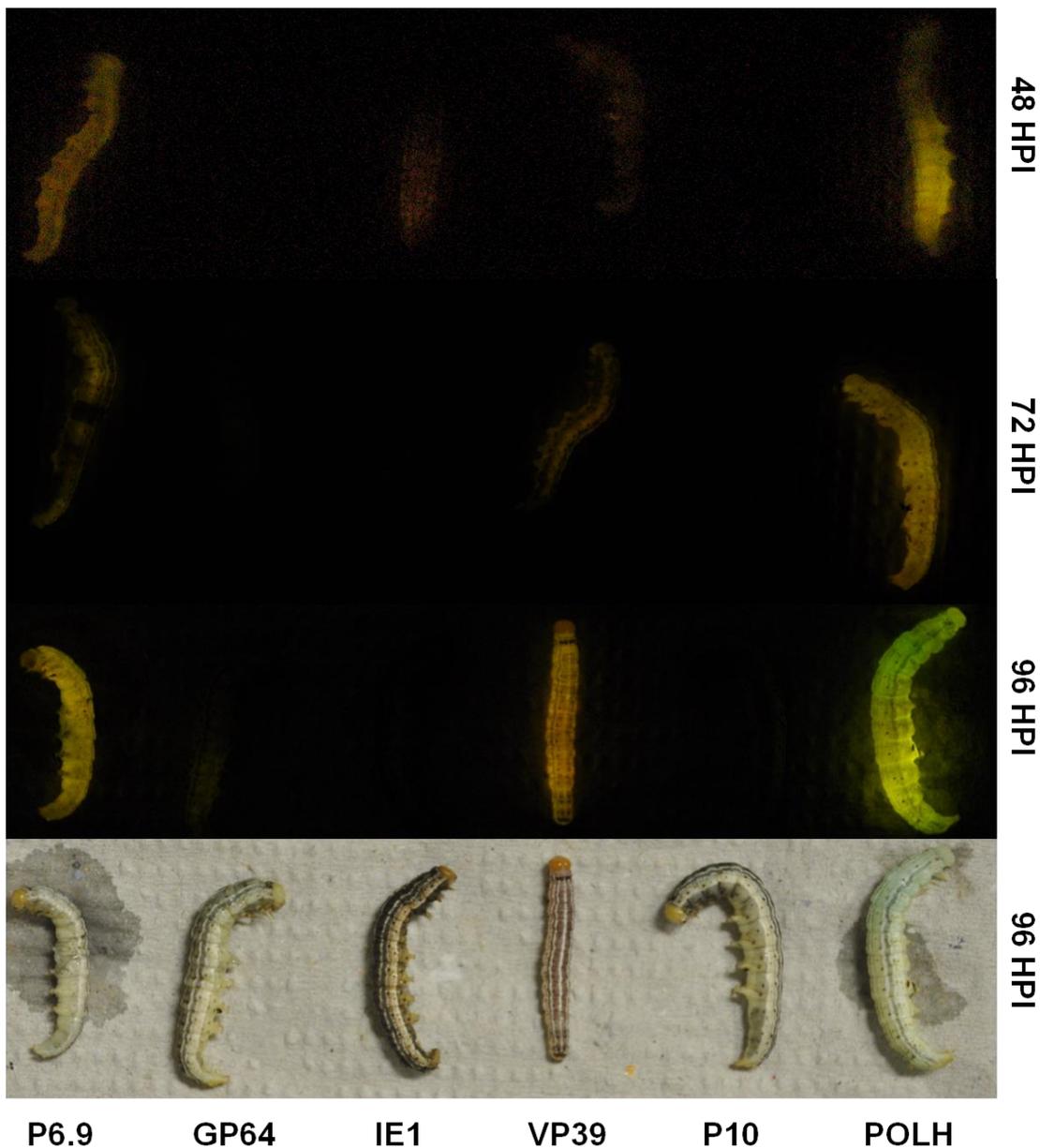


Figura 13: Fotografias em campo escuro e campo claro de larvas *Anticarsia gemmatalis* infectadas por via intrahemocélica com os baculovírus vAgIE1FLUC, vAgGP64FLUC, vAgVP39FLUC, vAgP69FLUC, vAgPOLHFLUC e vAgP10FLUC. Em diferentes tempos de infecção, foi injetado o reagente luciferina que induziu luminescência no corpo das larvas infectadas que foram fotografadas. De cada triplicata, a larva que apresentou maior luminescência foi selecionada para a fotografia.

Algumas das larvas AgMNPV infectadas neste ensaio não morreram e conseguiram metamorfosear em pupa. Para verificar se existe luminescência no corpo da pupa, foi injetada luciferina e a luminescência resultante foi fotografada em campo escuro (Figura 14). A luminescência observada provavelmente não é resultado de síntese *de novo* de luciferase a partir da infecção viral enquanto pupa, e sim derivada de luciferase produzida na infecção baculoviral enquanto larva. De qualquer forma, isto

evidencia o potencial de uso dos baculovírus recombinantes construídos neste trabalho, para analisar aspectos ecológicos da transmissão do baculovírus AgMNPV, devido à simplicidade em detectar indivíduos infectados.

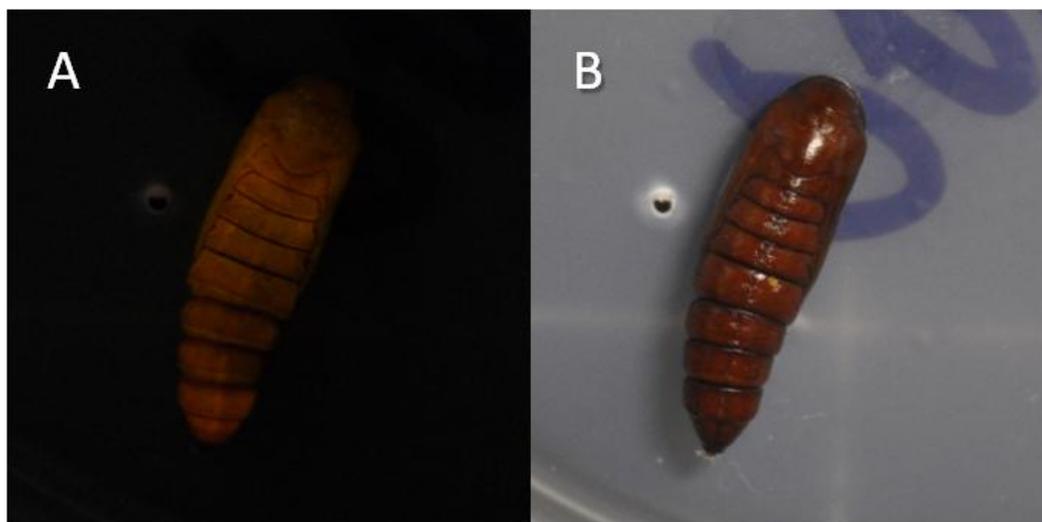


Figura 14: Fotografias em campo escuro e claro de pupa de *Anticarsia gemmatalis* infectada com o baculovírus vAgVP39FLUC. Foi injetada luciferina na pupa, para elicitar a luminescência derivada da expressão de luciferase.

A medição do progresso da infecção de larvas *Spodoptera frugiperda* com os recombinantes vAgIE1FLUC, vAgVP39FLUC, vAgP69FLUC e vAgPOLHFLUC por via intrahemocélica está apresentada no Gráfico 5.

Durante as primeiras 24 h, os níveis de luminescência da infecção pelos vírus vAgIE1FLUC, vAgVP39FLUC e vAgP69FLUC foram muito baixos, inferiores ao limite de 10 RLU, relativo ao *background* de luminescência detectado pelo modo luminômetro do equipamento Spectramax M5. Apenas o recombinante vAgPOLHFLUC foi capaz de induzir luminescência suficiente para ser considerada como valor positivo. Após 48 h p.i., os valores de luminescência das infecções subiram drasticamente.

O vírus vAgIE1FLUC induz um aumento de luminescência entre 24 e 48 h p.i., estabilizando em centenas de unidades luminosas ao longo do ensaio. Os vírus vAgVP39FLUC e vAgP69FLUC apresentaram um considerável atraso na expressão, os

valores de luminescência só se tornam significativos após 72 h p.i., com um aumento de 10 vezes entre 72 e 96 h p.i.. Após 96 h p.i., a luminescência da infecção pelo recombinante vAgVP39FLUC estabiliza próximo a 1000 RLU. O recombinante vAgP69FLUC induz valores de luminescência de 2000 RLU, a 120 h p.i. Para a infecção com o vírus vAgPOLHFLUC, a luminescência subiu 100 vezes entre 24 e 48 h p.i., 10 vezes entre 48 e 72 h p.i., e 5 vezes de 72 a 96 h p.i.. Após isto a luminescência se manteve no nível 2000 RLU.

Mesmo utilizando os promotores mais fortes durante a infecção das larvas *Anticarsia gemmatalis*, ie1, vp39, p69 e polh, na infecção de *Spodoptera frugiperda* os níveis de luminescência foram pelo menos 100 vezes menor. Além de valores muito menores, ocorreu um atraso de 24 h até ocorrer sinais definitivos de luminescência (acima de 10 RLU).

A variação em medições também foi muito maior do que os ensaios com larvas *Anticarsia gemmatalis*. Muitas larvas não apresentaram luminescência nos momentos de coleta do ensaio, e portanto foram excluídas como não infectadas. Praticamente todas as larvas efetivamente infectadas continuaram crescendo durante 8 dias após a injeção e avançaram para o 5º instar. A partir de então começaram a apresentar paralisia. Todas morreram antes de pupar, muitas melanizadas, e altos sinais de luminescência contidos na hemolinfa foram detectados, que apresentou um aspecto cremoso e esbranquiçado.

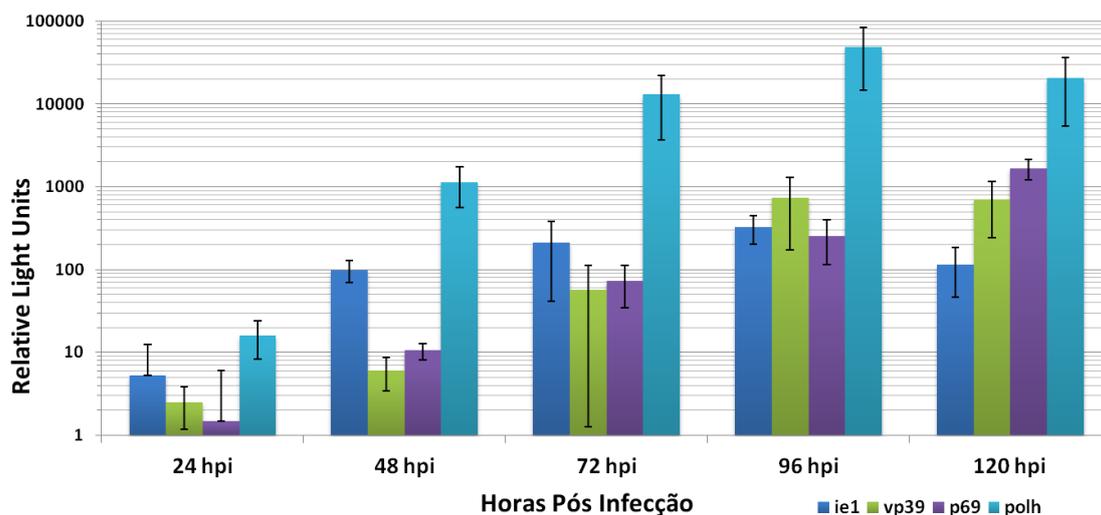


Gráfico 5: Histograma contendo os resultados de medição da hemolinfa de larvas *Spodoptera frugiperda* infectadas com os baculovírus recombinantes vAgIE1FLUC, vAgVP39FLUC, vAgP69FLUC e vAgPOLHFLUC por via intrahemocélica. As barras representam o valor da média das triplicatas e as barras de erro representam o desvio padrão em relação a média. Sem normalização.

4.5. Ensaios de detecção da atividade de luciferase em células de mamífero transduzidas

Para avaliar se o baculovírus AgMNPV é capaz de transduzir células de mamíferos cultivadas *in vitro*, células de câncer de mama humano MCF-7 e adenocarcinoma humano DUP145 foram inoculadas com o baculovírus recombinante vAgCMVFLUC, em duas multiplicidades de infecção distintas (MOI 10 e 30) e a luminescência foi monitorada ao longo de 24 h. Os resultados estão apresentados no Gráfico 6.

A transdução foi funcional nas primeiras 6 h para ambas MOI utilizadas, no entanto a MOI 30 claramente foi capaz de induzir maior luminescência, em especial na linhagem MCF-7, e fracamente na linhagem DUP145. A luminescência após 6 h p.t. foi muito baixa, muito próximo ao nível limite de exclusão que é considerada para o luminômetro Turner TD20/20, que é o valor 0,050 RLU, baseado na experiência do uso do equipamento. Em 24 h p.t., a variabilidade das triplicatas foi alta, sendo que uma amostra contendo células DUP145 infectadas com MOI 30, apresentaram luminescência

superior a 0,100, enquanto que as demais amostras resultaram em valores limítrofes, abaixo e próximos a 0,050.

Este resultado indica que os BVs do baculovírus AgMNPV são capazes de entrar em células de mamífero e induzir expressão transiente de genes heterólogos. Indiretamente, isto também implica que os BVs são capazes de atravessar a membrana de células de mamífero, o capsídeo é levado ao núcleo, desnudado e o DNA viral é transcrito, pois estes são passos essenciais para ocorrer a expressão de luminescência a partir da inoculação com o baculovírus. A expressão não dura muito tempo, após 6 h p.t. os valores foram reduzidos a praticamente zero. As células continuam a se dividir após a transdução e nenhum fenótipo citotóxico foi identificado por microscopia de luz.

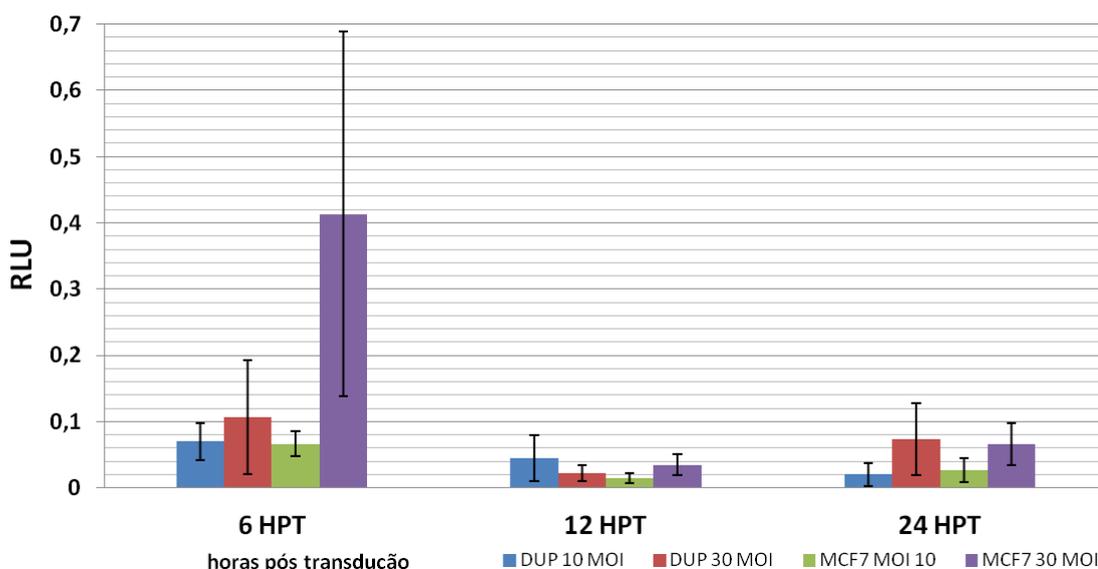


Gráfico 6: Histograma contendo os resultados de medição por lise de células de mamíferos DUP145 e MCF7 transduzidas com o baculovírus recombinante vAgCMVFLUC em duas multiplicidades de infecção (MOI) distintas. As barras representam o valor das médias de triplicatas. O erro é derivado do desvio padrão em relação à média de triplicatas. Normalização com base no número de células (10^5).

4.6. Análise da sequência dos promotores utilizados neste trabalho

4.6.1. Promotor CMV

Baculovírus AcMNPV recombinantes contendo este promotor foram capazes de entrar em diversas linhagens de células de mamífero, e o gene de interesse contido no DNA baculoviral é transcrito a partir do promotor CMVie1 (Condreay *et al.*, 1999;

Ghosh *et al.*, 2002). Vale notar que o baculovírus AcMNPV é capaz de entrar em células de mamíferos cultivadas *in vitro* por meio da proteína de envelope GP64, sem alterações nesta última, muito possivelmente pelo mesmo mecanismo de endocitose mediada por receptor que ocorre em células de inseto (Kenoutis *et al.*, 2006; Ghosh *et al.*, 2002). Um uso avançado deste tipo de construto é a utilização de BVs como vacina baseada em sistema de expressão, por exemplo, pela aplicação direta intranasal de um baculovírus recombinante expressando a proteína PVS25 do agente da malária, *Plasmodium vivax*, sob controle do promotor CMVie1. A expressão de genes de interesse nos tecidos da mucosa nasal de camundongos induziu uma resposta imune humoral forte, capaz de conferir proteção contra o agente infeccioso, mesmo que a via de aquisição do vírus não seja por mucosas (Blagborough *et al.*, 2010).

O gene *immediate early 1 (ie1)* do citomegalovírus humano (CMV, Herpesviridae) possui um promotor forte em células de mamíferos, cujo sítio de iniciação nestas condições é a sequência ACCGT, iniciando entre G e T. Também associado ao promotor, e como um elemento essencial deste, ocorre uma região *enhancer* de transcrição, -530 a -120 pb a montante do sítio de início da transcrição (Fickenscher *et al.*, 1989).

No que concerne a expressão a partir do promotor CMVie1 em células de inseto, ainda não é claro qual o real motivo iniciador de transcrição, portanto em nível de sequência, é classificado como um promotor sem INR (INR-), que contém um motivo TATA box (TATA+, -23 pb). A atividade do promotor CMVie1 em células de inseto é baixa, conforme reportado por Condreay *et al.* (1999), apesar do autor não suprir os dados referentes à expressão. Outro relato da atividade deste promotor em células de inseto, relatado por Fang *et al.* (2008), indicou baixa atividade do promotor CMVie1 na linhagem Sf9 transfectada com plasmídeos contendo o promotor CMVie1 regulando o

gene *fluc*. A região *enhancer*, também é funcional e essencial para expressão em células de inseto pois a deleção desta reduz a praticamente zero a atividade do promotor mínimo (Wu *et al.*, 2000).

Neste trabalho, o promotor CMV_{ie1} completo (781 pb) foi utilizado, derivado do plasmídeo pRLCMV (Promega), contendo a região *enhancer* até o motivo iniciador ACCGT, sem o *intron* A que ocorre a jusante do sítio de iniciação da transcrição, no plasmídeo de origem. Na sequência deste promotor existe apenas um motivo iniciador da fase tardia similar a baculovírus que está sobreposto ao elemento TATA, formando a sequência TATAAG (Figura 15). Apesar de servir como INR durante infecção baculoviral, o motivo TAAG exige condições para atuar como promotor baculoviral (Miller, 1997) e como não existem trabalhos mostrando o real sítio de iniciação da transcrição deste promotor em células de inseto, não é possível considerar o híbrido TATA sobreposto ao motivo tardio TAAG como um INR, pelo menos até existirem dados experimentais como evidência disto. Da mesma forma, diversos elementos INR de transcrição na fase precoce ocorrem no promotor e foram identificados com base na sequência, apenas. Os elementos acima comentados estão relatados na Figura 15.

O principal objetivo de clonar este promotor, controlando o gene FLUC, no baculovírus AgMNPV, é para podermos avaliar a capacidade da partícula viral, produzida durante a infecção de células de inseto, de entrar em células de mamíferos e induzir a expressão do gene repórter.

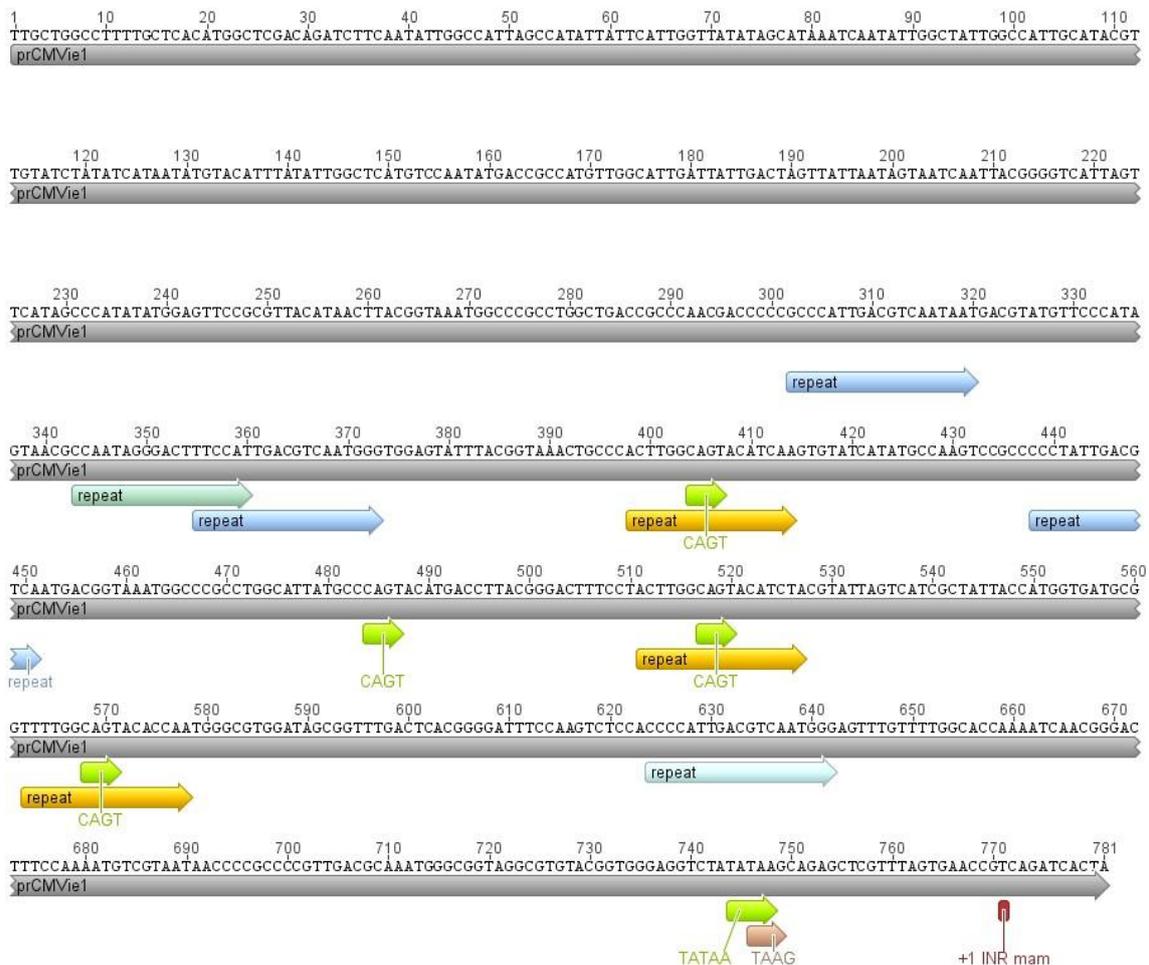


Figura 15: Sequência do promotor CMVie1 (781 pb), isolado do plasmídeo pRLCMV (Promega). A região *enhancer* deste promotor é composta por diversas repetições de 17 a 21 pb dispersas a montante do sítio de iniciação em mamíferos (+1 INR) na posição 771 pb (Fickenscher, 1989). Os elementos INR de transcrição precoce (CAGT) e o elemento TATA box estão realçados em verde, o elemento INR de transcrição tardia TAAG em violeta, detectados com base na sequência.

4.6.2. Promotor IE1

A transcrição deste gene ocorre imediatamente após a entrada do vírus na célula, em AcMNPV. Este promotor pode ser classificado como INR+ e TATA+, sendo que o elemento INR é a sequência CAGT, transcrição iniciando após o nucleotídeo C deste motivo, o elemento TATA box se encontra -30 pb a montante do INR (Pullen & Friesen, 1995), em AgMNPV o elemento TATA box se encontra a -27 pb a montante do INR (Figura 16 B).

Em AcMNPV, ocorre um elemento DAR, encontra-se +7 a +24 a jusante do INR, identificado pela sequência CACNG, importante para manter o nível máximo de

expressão a partir do promotor ie1 (Pullen & Friesen, 1995). Em AgMNPV, o motivo DAR é fracamente similar ao de AcMNPV, apresentando a sequência principal CAGCC, apesar de conservar a posição +7 pb relativa ao INR, de fato o elemento DAR do grupo filogenético a que o AgMNPV pertence é pouco conservado dentro deste clado (71% de identidade pareada), enquanto que o elemento DAR do baculovírus AcMNPV é bastante conservado dentro do grupo filogenético a que este último pertence, lembrando que ambos são cladros distintos dentro do Grupo I dos *Alphabaculovirus*. Existe um elemento CACNG, possível DAR, completo na posição +31 pb a partir do INR CAGT, sequência CACCG, que não ocorre nos demais baculovírus.

A sequência mais conservada do promotor ie1 corresponde as posições -34 até +15 pb, apresentando 93% de identidade pareada, que engloba os elementos TATA, INR e parcialmente o elemento DAR. A região a montante do INR até -343 pb também é relativamente conservada entre os *Alphabaculovirus*, apresentando até 75% de identidade pareada (figura 16 B).

Um elemento DAR já foi descrito no promotor gp64 de AcMNPV, a +20 pb a jusante do INR de fase precoce CAGT, identificado pela sequência CACAG (Miller, 1997), no entanto não ocorre qualquer sequência similar ao motivo consenso DAR (CACNG) na região equivalente no promotor gp64 de AgMNPV. Dois elementos UAR foram identificados no genoma de OpMNPV, os elementos GATA a -40 pb e o elemento CACGTG a -60 pb a partir do INR de fase precoce, estes são importantes na manutenção da atividade do elemento INR na falta de elementos TATA box (Kogan, Chen & Blissard, 1995). Estes elementos não ocorrem no genoma de AgMNPV, que ao invés, possui as sequências AATA e CACGTT. O elemento UAR -20 pb AATA em AgMNPV é único à esta espécie de baculovírus, sendo bem conservada como GATA nos demais *Alphabaculovirus*.

O promotor gp64 possui uma região relativamente conservada (85% de identidade pareada), representando o núcleo do promotor que contém os elementos essenciais para regulação transcricional, entre -50 e +3 pb em relação ao CAGT, sendo o A a posição +1, que inclui o INR da fase precoce e o TATA box a -24 pb (Figura 17 B). Além deste núcleo, o promotor não é conservado entre os *Alphabaculovirus* (abaixo de 60% de similaridade), vale notar que uma busca BlastN utilizando a sequência conservada do promotor gp64 de AgMNPV apenas indica semelhança deste promotor com os organismos mais próximos filogeneticamente, entre eles, CfMNPV e o CfDEFNPV, *Hyphantria cunea* MNPV, *Orgyia pseudotsugata* MNPV e *Epiphyas postvittana* MNPV. Em contraponto, uma busca BlastN da sequência de DNA da ORF do gene gp64 revela que a proteína é bem conservada dentro dos *Alphabaculovirus*. Neste caso, propõe-se uma hipótese, em que o promotor gp64 evoluiu de forma independente à ORF GP64, provavelmente buscando a otimização da infectividade

sistêmica dentro de cada hospedeiro distinto, regulando o tempo expressão inicial da proteína.

Existe uma possível explicação para a grande diferença entre este promotor de AgMNPV em relação aos demais baculovírus. A organização dos genes ao redor do gene *gp64*, em AgMNPV, é distinta dos demais *Alphabaculovirus*. A jusante da ORF GP64, ocorreu um evento de recombinação que excluiu os genes *quitinase* e *catapsina*, presente nesta mesma posição relativa nos genomas dos demais *Alphabaculovirus*, inclusive no genoma do baculovírus mais próximo, que é o CfDEFNPV.

Em AgMNPV e AcMNPV, a região até -340 pb a partir do ATG é uma região intergênica, que corresponde ao promotor *gp64*, além disto ocorre o gene *p24* na fita antisenso em relação a ORF do gene *gp64*. Nos genomas dos baculovírus filogeneticamente próximos, CfMNPV, EppoNPV e OpMNPV, a região a montante do gene *gp64* contém diversos elementos que distanciam o gene *p24* do gene *gp64*, ao invés de conter o gene *p24* (Slack, Ribeiro & de Souza, 2004). Isto explica a completa falta de identidade entre as sequências a montante de -340 pb (Figura 17 A). Esta região a montante do gene *gp64* do AgMNPV, muito possivelmente sofreu recombinações que poderiam ter perdido as sequências existentes nos baculovírus próximos, assim reduzindo a distância entre *gp64* e *p24*, ou ainda esta região pode nunca ter sofrido uma recombinação que incluiria alguma das sequências contidas nos baculovírus próximos. O efeito destas diferenças na sequência dessas regiões sobre a transcrição do gene *gp64* não é conhecida.

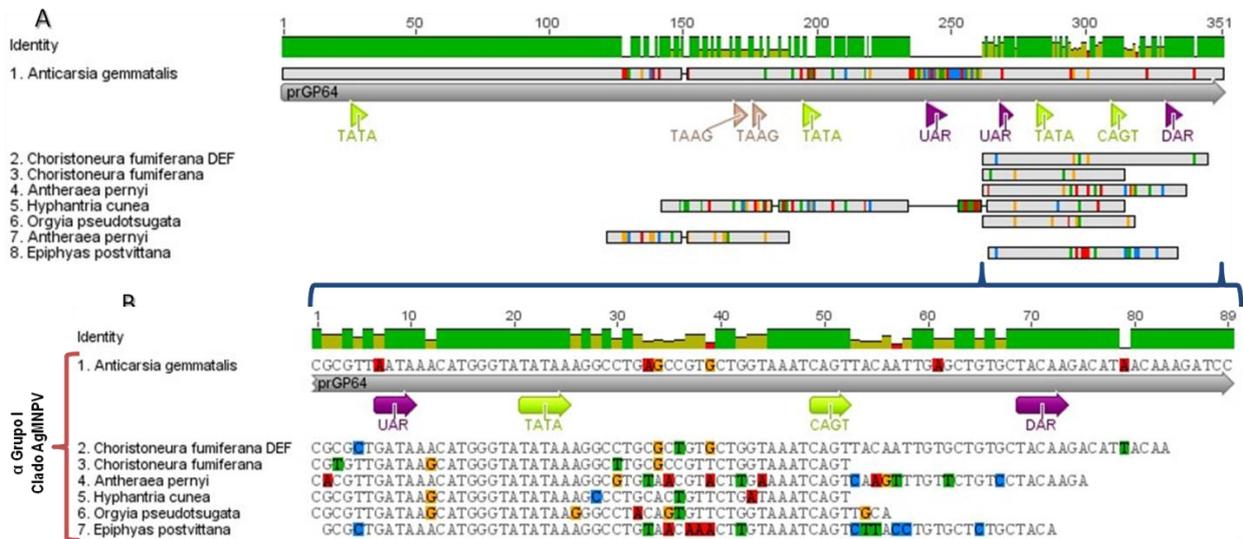


Figura 17: Alinhamento dos resultados da pesquisa BlastN utilizando a sequência do promotor gp64 de AgMNPV (A). Foco na sequência core do promotor gp64 e classificação dos grupos filogenéticos dentro dos *Alphabaculovirus* (B). Nos alinhamentos: *identity* reflete o grau de conservação entre as sequências, os elementos transcripcionais detectados no promotor de AgMNPV tem suas posições e descrições nas setas coloridas, variações entre as sequências aparecem como letras coloridas. Os baculovírus estão organizados em ordem descendente de similaridade com o promotor de AgMNPV.

4.6.4. Promotor VP39

Recentemente foi feita a caracterização do promotor vp39 do baculovírus BmNPV como um promotor precoce, quando associado à HR3 do mesmo genoma, além de relatar que a expressão derivada do promotor ocorre 24 h mais cedo que o promotor polh, a expressão acumulou quantidades equivalentes ao promotor polh (Ishiyama & Ikeda, 2010). Além disto, é importante comentar que no trabalho de Morris & Miller (1994), que classificou o promotor vp39 de AcMNPV como um promotor tardio, não existem medições precisas da atividade desse promotor durante as primeiras 6 h de infecção.

O promotor vp39 do baculovírus AgMNPV nunca foi estudado anteriormente e esta é a primeira análise detalhada da sequência e atividade deste promotor. Este é um promotor INR+ de fase tardia e TATA+. A sequência principal do promotor se encontra nos 99 nucleotídeos a montante do códon de iniciação do gene vp39 (Morris & Miller, 1994), além de ser uma região conservada entre todos *Alphabaculovirus*, Grupos I e II (85% de similaridade), em AgMNPV esta região possui 3 elementos INR de fase tardia

4.6.5. Promotor P6.9

Em AcMNPV, o gene *p6.9* é abundantemente expresso na fase tardia da infecção, o início da transcrição ocorre no motivo de transcrição tardia ATAAG (Wilson, 1987), entretanto, o promotor do gene *p6.9* do baculovírus AgMNPV possui uma variação pontual, tornando a sequência GTAAG, ainda aceitável como consenso de transcrição tardia, esta variação é compartilhada com outros baculovírus de seu clado, como AnpeNPV e EppoNPV (Figura 19).

Não ocorrem elementos TATA box na sequência do promotor, desta forma, este é classificado como um promotor INR+ de fase tardia e TATA-. Em AcMNPV ocorre a sequência AGCGTAAAAAA logo a montante (-18 pb) do sítio de início de transcrição, esta sequência ocorre no promotor do gene tardio *39K* em posição similar (Wilson *et al.*, 1987), de fato esta sequência é conservada entre os *Alphabaculovirus* do Grupo I, ramo do AcMNPV, enquanto que no ramo do AgMNPV ocorre a conservação de sequência similar mas distinta, AGCGCAAAAAA. A -32 pb do início da transcrição, ocorre uma sequência adicional e bastante conservada apenas nos baculovírus do ramo AcMNPV (TTCAGTCGT), esta sequência é inexistente no AgMNPV ou em outros baculovírus de seu ramo filogenético (Figura 19).

No genoma AgMNPV, a região -40 pb até o TAAG é intergênica, a montante de -40 pb ocorre o gene *p40*, transcrito em direção oposta à ORF do gene *p6.9*. Tanto o núcleo transcricional do promotor P6.9 (sequências próximas ao TAAG), quanto sequências a montante e distais são relativamente conservadas (acima de 80% de identidade pareada), a região distal pode ser conservada devido à presença da ORF P40 (Figura 19).

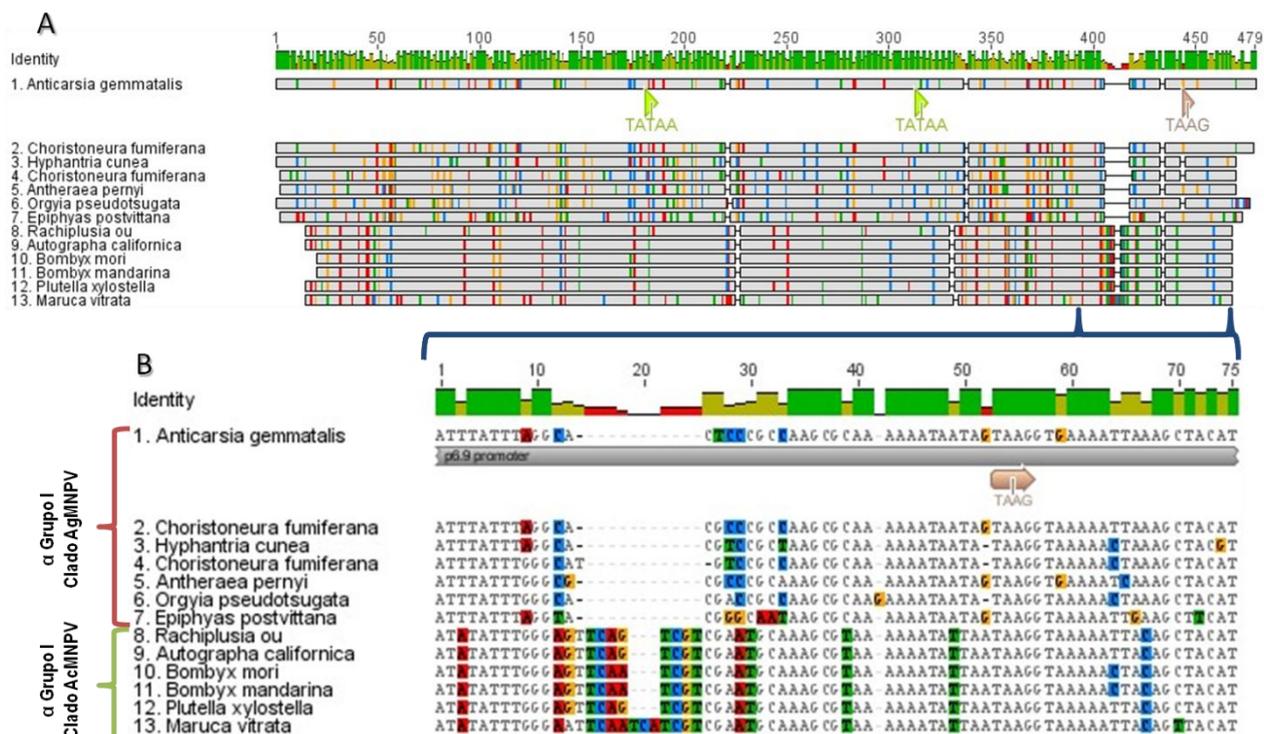


Figura 19: Alinhamento dos resultados da pesquisa BlastN utilizando a sequência do promotor p6.9 de AgMNPV (A). Foco na sequência *core* do promotor p6.9 e classificação dos grupos filogenéticos dentro dos *Alphabaculovirus* (B). Nos alinhamentos: *identity* reflete o grau de conservação entre as sequências, os elementos transcripcionais detectados no promotor de AgMNPV tem suas posições e descrições nas setas coloridas, variações entre as sequências aparecem como letras coloridas. Os baculovírus estão organizados em ordem descendente de similaridade com o promotor de AgMNPV.

4.6.6. Promotor P10

O promotor p10 de AgMNPV possui algumas características que o distinguem do promotor p10 de AcMNPV, sendo um promotor INR+ de fase tardia e TATA+. Em AgMNPV, ocorre um elemento INR de fase tardia, TAAG, está posicionado a -35 pb a montante do codon de iniciação da tradução da proteína P10, enquanto que no genoma de AcMNPV o elemento INR ocorre na posição -72 pb, isto quer dizer que em AgMNPV o elemento INR está 33 pb mais próximo do codon de iniciação, e isto pode representar a perda de elementos DAR ainda desconhecidos, possivelmente até mesmo uma parcela da sequência *burst*, comum em promotores polh e indutoras de hiperexpressão em momentos muito tardios da infecção. Os dois promotores, de AgMNPV e AcMNPV, só compartilham homologia em uma sequência de 40 pb imediatamente a partir do INR de fase tardia, uma homologia de 77% de identidade

pareada, isto está em contraposição à baixa homologia de sequências a montante do INR, com 58% de identidade pareada.

Outras diferenças observadas foram a existência de um elemento INR de fase precoce CAGT a -178 pb, e um elemento TATA box, imediatamente a montante do INR de fase tardia TAAG (-35 pb a partir do ATG, Figura 20 B). Ambos elementos são únicos ao baculovírus AgMNPV e não existem dados experimentais para relatar a funcionalidade deles.

A sequência do promotor p10 de AgMNPV possui uma região bastante conservada (85%) entre *Alphabaculovirus* Grupo I do clado AgMNPV, que é a região que engloba os 31 pb a jusante do INR da fase tardia (Figura 23, B). A montante do INR as sequências são menos similares (75%), mas relativamente conservadas.

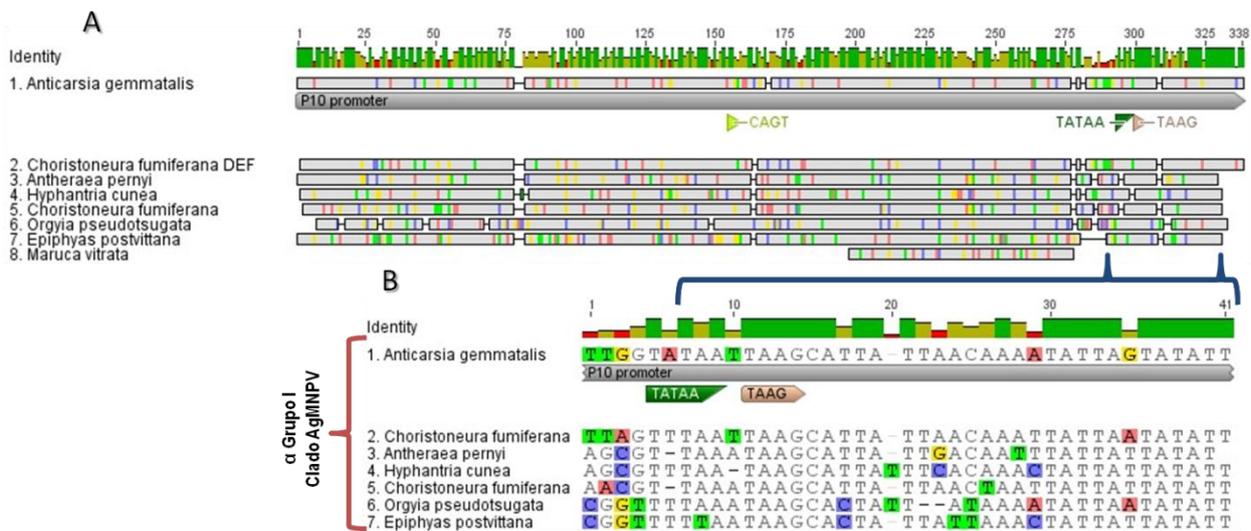


Figura 20: Alinhamento dos resultados da pesquisa BlastN utilizando a sequência do promotor p10 de AgMNPV (A). Foco na sequência *core* do promotor p10 e classificação dos grupos filogenéticos dentro dos *Alphabaculovirus* (B). Nos alinhamentos: *identity* reflete o grau de conservação entre as sequências, os elementos transcripcionais detectados no promotor de AgMNPV tem suas posições e descrições nas setas coloridas, variações entre as sequências aparecem como letras coloridas. Os baculovírus estão organizados em ordem descendente de similaridade com o promotor de AgMNPV.

4.6.7. Promotor POLH

Um dos primeiros dados de sequenciamentos do genoma do baculovírus AgMNPV mapeou o *locus* do gene *polh* (Maruniak *et al.*, 1992). O promotor *polh* de AgMNPV é similar ao homólogo em AcMNPV, por possuir um INR de fase tardia, no

entanto existe uma sequência consenso TATA box a -33 pb a partir da sequência TAAG, o classificando como INR+ de fase tardia e TATA+. Além disto, a sequência do promotor polh além de -54 pb, só é capaz de alinhar com os baculovírus próximos do AgMNPV, nominalmente CfDEFNPV e AnpeNPV. Ainda em comparação com o baculovírus AcMNPV, foi observado que a região a montante da poliedrina ocorre a ORF 603, que não existe no genoma de AgMNPV, ao invés disto este vírus possui a ORF 2, definida como hipotética com base no sequenciamento pois não existem dados que comprovam a síntese desta ORF, de qualquer forma é uma sequência única dos organismos filogeneticamente próximos do AgMNPV. Isto explica o baixo nível de similaridade entre as regiões a montante da posição -52 pb dos promotores polh de *Alphabaculovirus* do Grupo I.

A região da posição -52 a -1 pb a partir do ATG de iniciação da tradução é conservada parcialmente (Figura 21 B). O elemento INR de fase tardia, comum em todos promotores polh, possui uma distância conservada entre os demais elementos *cis* conservados, enquanto que a sequência entre os elementos varia. Existe a possibilidade que a distância entre elementos *cis* seja conservada devido ao espaço exigido pelos fatores de transcrição na montagem do complexo transcricional (Maruniak *et al.*, 1992).

No baculovírus AgMNPV, nota-se que a região até -52 pb, contendo o INR de fase tardia e a sequência *burst* do promotor polh não foi alterada com a presença da ORF 2, além disto a atividade do promotor manteve-se similar ao descrito na literatura, com forte expressão durante a fase muito tardia da infecção (a partir de 24 h p.i.). Isto indica uma possível seleção em conjunto do construto promotor polh e ORF POLH, que mantêm o *timing* de expressão deste gene muito tardio. Uma previsão desta hipótese seria que no meio ambiente, linhagens de baculovírus em que o promotor polh tem atividade na fase precoce da infecção não são fixados na população, pois a expressão

deste gene em momentos precoces compromete a formação de poliedros completamente formados, com um número razoável de partículas virais em seu interior e efetivamente infectivos para larvas que os ingerem.

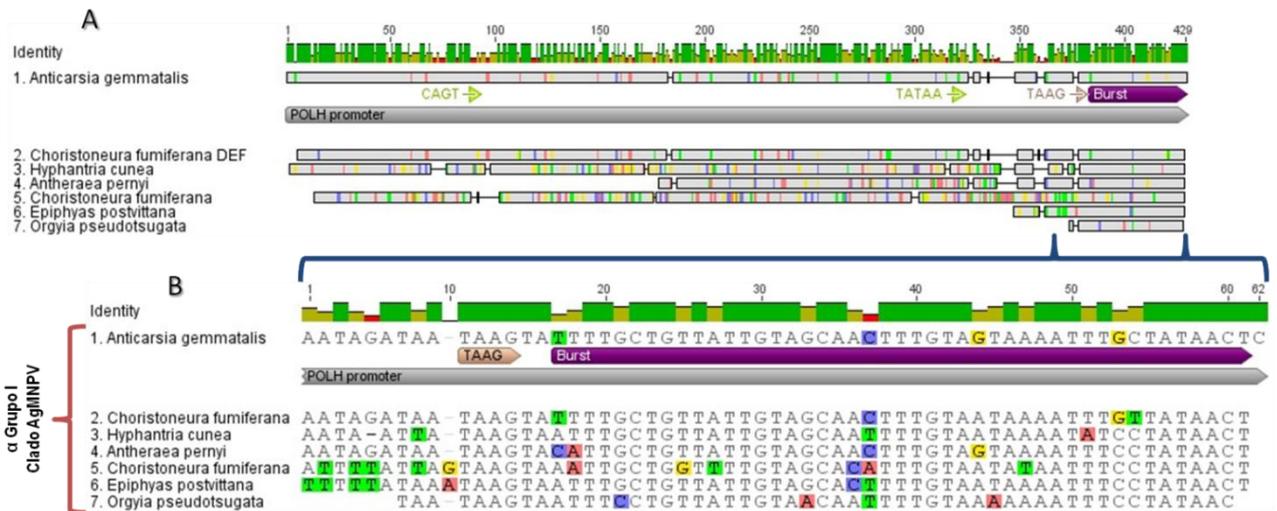


Figura 21: Alinhamento dos resultados da pesquisa BlastN utilizando a sequência do promotor polh de AgMNPV (A). Foco na sequência *core* do promotor polh e classificação dos grupos filogenéticos dentro dos *Alphabaculovirus* (B). Nos alinhamentos: *identity* reflete o grau de conservação entre as sequências, os elementos transcrpcionais detectados no promotor de AgMNPV tem suas posições e descrições nas setas coloridas, variações entre as sequências aparecem como letras coloridas. Os baculovírus estão organizados em ordem descendente de similaridade com o promotor de AgMNPV.

4.6.8. Promotor HEL

Em AgMNPV, o gene *helicase* foi estudado previamente ao sequenciamento do genoma deste vírus. O mRNA deste gene foi detectado de 4 h p.i. até 10 h p.i. por RT-PCR, o que classifica-o como um gene da fase precoce. O sítio de iniciação da transcrição foi localizado a -187 pb a montante do ATG de iniciação da tradução da ORF, no primeiro A da sequência CAAT (de Lima *et al.*, 2004). Em AgMNPV ocorre um elemento INR de fase precoce CAGT, na posição -169 pb, 6 pares de base a jusante do INR CAAT identificado experimentalmente.

Em AcMNPV, o sítio de iniciação foi localizado a -154 pb a montante do ATG de iniciação de tradução da proteína HEL, dentro da sequência de iniciação GCGTGC (Ohresser *et al.*, 1995). Esta sequência GCGTGC não ocorre no promotor de AgMNPV, que apresenta a sequência GTGTGC (Figura 22). Este elemento GTGTGC é conservado

entre os *Alphabaculovirus* Grupo I do clado AgMNPV, e surpreendentemente também é conservado no promotor de BmNPV e *Bombyx mandarina* NPV, dois *Alphabaculovirus* Grupo I do grupo AcMNPV.

Em AcMNPV ocorre o motivo de fase tardia GTAAG na posição -72 a partir do ATG que é ativo após 12 h p.i. (Ohresser *et al.*, 1995). Em AgMNPV, na posição -76, ocorre a sequência TTAGG, com duas modificações em relação ao GTAAG de AcMNPV. Em contrapartida, em AgMNPV, na posição -133 ocorre um elemento GTAAG adicional, que em AcMNPV teria como equivalente ATACG (de Lima *et al.*, 2004). Também já foi identificado um minicistron no mRNA do gene *hel* em AcMNPV que causa diminuição da expressão deste gene, este elemento é uma pequena ORF imediatamente a jusante da sequência GTAAG na posição -72 pb, a presença deste minicistron reduz a tradução da ORF do gene *hel* a jusante (Ohresser *et al.*, 1995). Em AgMNPV, apesar de não existir o elemento INR TAAG, como descrito anteriormente, possui dois minicistrons em posição equivalente à do AcMNPV, mas com fase e sequências distintas. Este dois minicistrons de AgMNPV estão contidos no mRNA a partir do início de transcrição -187 pb, relatado por de Lima *et al.*, 2004.

O promotor *hel* é relativamente conservado (80% de identidade pareada), sendo que a região -40 a -250 pb a montante do códon de iniciação possui uma identidade de 86%. Existem elementos absolutamente conservados entre *Alphabaculovirus* Grupo I que não foram descritos na literatura, entre eles os elementos GTGTTGT a -102 pb, TAACA na posição -171 e AACACGTT na posição -245. Enquanto que os elementos previamente descritos como bem conservados em AcMNPV e demais, que seriam os elementos INR detectados, GCGTGC e TAAG, na realidade não são conservados entre os *Alphabaculovirus* (Figura 22 B).

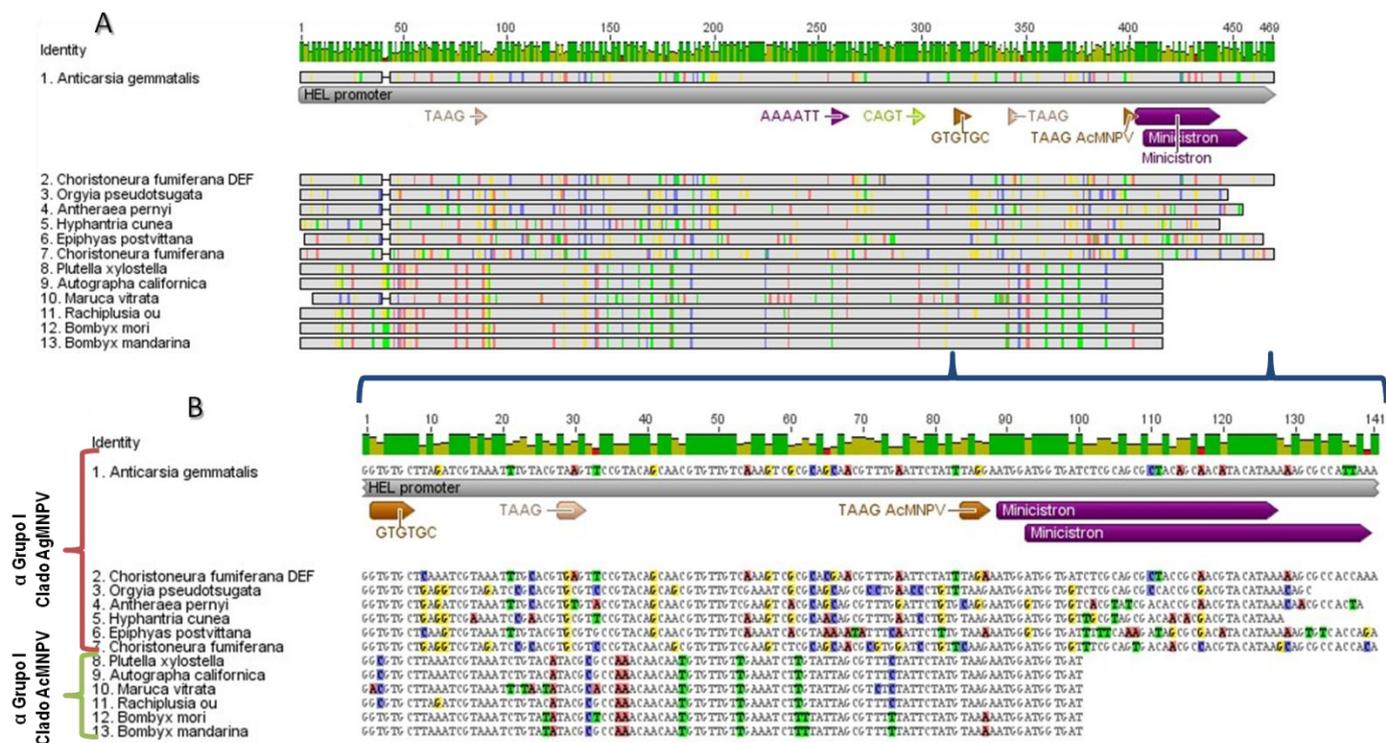


Figura 22: Alinhamento dos resultados da pesquisa BlastN utilizando a sequência do promotor hel de AgMNPV (A). Foco na sequência core do promotor hel e classificação dos grupos filogenéticos dentro dos *Alphabaculovirus* (B). Nos alinhamentos: *identity* reflete o grau de conservação entre as sequências, os elementos transcricionais detectados no promotor de AgMNPV tem suas posições e descrições nas setas coloridas, variações entre as sequências aparecem como letras coloridas. Os baculovírus estão organizados em ordem descendente de similaridade com o promotor de AgMNPV.

5. DISCUSSÃO E PERSPECTIVAS

5.1. Luciferase como gene repórter para análise de promotores durante a infecção de baculovírus

Sem dúvidas, o gene *luciferase* de vaga-lume é o gene repórter mais utilizado em análise de atividade de promotores por clonagem molecular e ensaios de expressão atualmente, seguido pelo gene repórter *Green Fluorescent Protein (GFP)*, que depende da incidência de luz ultravioleta (UV) e consequente emissão de fluorescência a partir da excitação da proteína GFP. A luz UV reage com diversos componentes celulares e resulta em emissões indesejadas, gerando *background* de fluorescência que irá interferir na resolução e sensibilidade do ensaio de detecção. Em comparação, o *background* de luminescência em células de inseto e em materiais derivados de larvas de inseto são extremamente baixos, praticamente zero, isto permite uma maior sensibilidade, tornando possível a detecção de sinais bem fracos de luminescência. Além disto, a proteína FLUC não possui efeito citopático conhecido em células e organismos utilizados em laboratórios, o que implica em uma análise não destrutiva da expressão desta proteína.

Não foram encontradas espécies da ordem Lepidoptera que realizam quimioluminescência de algum tipo, ou expressam gene homólogo a luciferases ou mesmo contém moléculas análogas a D-luciferina, o que implica em um *background* de luminescência muito baixo das células de inseto derivadas de Lepidoptera, como as utilizadas neste trabalho. Nestas condições, a quimioluminescência derivada da expressão de luciferase a partir dos baculovírus é uma ferramenta essencial na análise da atividade de promotores, sendo possível quantificar a atividade com a ajuda de um luminômetro e até mesmo observar visualmente o progresso da infecção viral e acúmulo de luciferase por meio de fotografias de alto tempo de exposição.

É importante ressaltar que ao medir a luminescência da enzima luciferase, mede-se indiretamente a transcrição do gene, no entanto, como já foi demonstrado em diversos sistemas de expressão (Allard & Kopish, 2008), existe uma correlação direta entre luminescência, quantidade de proteína luciferase e quantidade do mRNA deste gene. Portanto, esta medição agrega os processos transcricionais, pós transcricionais, traducionais e pós-traducionais. Para o objetivo de comparar a produtividade de cada promotor e avaliar a eficiência do sistema de expressão baculoviral, o que importa realmente é o produto final, a proteína funcional. Não é possível tirar conclusões referentes aos processos específicos dentro da síntese de proteínas.

5.2. A infecção de células de inseto cultivadas *in vitro*

O monitoramento da produção de luciferase a partir dos baculovírus AgMNPV recombinantes construídos costuma ser realizada pela lise do material celular a ser avaliado, este tipo de análise envolve a coleta de triplicatas de populações de células infectadas, lise e medição da luminescência derivada do extrato celular resultante.

Este tipo de medição tenta avaliar uma variável contínua, a produção de luciferase ao longo da infecção, com uma abordagem de variável discreta. Como as populações de células mensuradas foram distintas ao longo da infecção, devido a necessidade de lise da amostra, existe um erro intrínseco derivado da amostragem entre populações, dentro do mesmo tratamento. O erro intrínseco é avaliado com base no erro padrão em relação a média das triplicatas biológicas. Este tipo de medição é interessante, pela capacidade de mensurar o erro de amostragem e a possibilidade de medir o total de proteínas de cada amostra, e assim normalizar os dados com base nisto. No entanto, a variável em questão é derivada de um processo biológico e contínuo, e muita informação importante é perdida entre os longos intervalos da medição de luminescência por lise das células.

Para solucionar este problema, uma metodologia alternativa em que o substrato da reação quimioluminescente é adicionado ao meio de cultura das células a serem infectadas pelos recombinantes, em uma concentração capaz de elicitar luminescência detectável ao longo de 120 h de ensaio e não causar efeitos citopáticos, além dos causados pelo baculovírus. Após a infecção com os recombinantes, a produção de luciferase induz imediata luminescência que pode ser mensurada em “tempo real”, sem lise celular, permitindo a medição repetida da amostra em intervalos flexíveis. A medição da produtividade de luciferase de uma mesma população de células ao longo do tempo de infecção permite a composição de uma curva de expressão no formato série temporal, com alta riqueza de dados e portanto resolução, assim o ensaio foi denominado como **medição contínua de luminescência**. Além disto, o ensaio de medição contínua possui um custo muito inferior ao ensaio por lise celular, para cada medição do ensaio por lise foram exigidos três poços de uma placa de crescimento de células. Para fazer 10 medições ao longo de 48 h de ensaio, então foram necessárias 3 placas para cada vírus, enquanto que no ensaio de medição contínua, um único tubo contendo 500 mil células resulta em 80 medições ao longo de 120 h de ensaio. Isto representa um avanço considerável na aquisição de informações biológicas, pois o bioensaio de detecção de luminescência se torna não invasivo.

O fundamento desta técnica está em adicionar luciferina no meio de cultura a ser utilizado. Um dia antes da infecção e início do bioensaio propriamente dito, o meio de cultura das células é trocado pelo meio modificado contendo luciferina, as células então crescem este último dia em contato com a molécula luciferina que permeia para o interior das células. Observações por microscopia de luz indicam que as células de inseto utilizadas neste trabalho não foram afetadas pela presença de luciferina no meio

de cultura, pois não foram observados a presença de apoptose, lise celular ou redução na velocidade de crescimento da população de células.

Um ponto importante referente ao ensaio de medição contínua, é que devido a alta estabilidade da enzima recombinante luciferase utilizada, que sofreu mutações direcionadas para perder resíduos de cisteína e assim manter a proteína como monômero, deleções nas sequências de aminoácidos que a direcionam para os peroxissomos em vaga-lumes tornando a proteína solúvel no citoplasma e mutações em sequências de aminoácidos alvo de proteases conhecidas o que indica alta estabilidade ou lento *turn over* (Allard & Kopish, 2008). Levando estes pontos em consideração, acredita-se que os ensaios de medição contínua só são capazes de avaliar o aumento de luminescência da amostra, isto é, o acúmulo de luciferase dentro da célula. Flutuações negativas na transcrição a partir do promotor a montante da enzima luciferase não serão detectadas pois o sinal de luminescência não irá diminuir. As flutuações negativas de algumas medições possivelmente estão relacionadas ao consumo de um dos reagentes da reação, como ATP ou O₂.

A infecção celular causada por baculovírus exige uma sequência específica e discreta de expressão de genes virais, cada qual com uma função que está posicionada em um tempo e espaço específico durante a infecção, assim existe uma espécie de “programa de expressão gênica”, que é regulada a nível transcricional, isto é, o momento e volume da síntese das proteínas virais é regulada pelos promotores gênicos e os elementos *cis* e *trans* que interagem com estes promotores (Miller, 1993). A falha no *timing* e quantidade de expressão dos genes da fase precoce, resulta em uma infecção não produtiva, isto é, uma baixa produção de progênie viral e fenótipos infectivos, o que caracteriza a célula como não permissiva.

Quando a atividade individual dos promotores é observada durante a infecção das células suscetíveis UFL-AG-286, BTI-Tn-5B1-4 e IPLB-SF21-AE (gráfico 2), o programa de expressão gênica é bastante claro: *ie1*, *gp64*, *vp39*, *p6.9*, *polh*, *p10*. Esta sequência de ativação dos promotores é bastante lógica, se considerarmos as funções de cada gene, por exemplo, a proteína IE1 transativa os promotores da fase precoce, induzindo uma expressão mais intensa a partir destes, conseqüentemente transativa o próprio gene *ie1* e o gene *gp64*. É essencial que esta proteína transativadora ocorra imediatamente após a entrada do vírus, para garantir um rápido acúmulo de GP64 na membrana celular em preparo a formação de BVs, e acúmulo de outras proteínas estruturais e não estruturais da fase precoce dentro da célula. Falha neste processo implica em um ambiente celular desfavorável para a replicação do vírus e pode resultar em uma infecção abortiva. As proteínas estruturais do capsídeo, VP39 e P6.9, devem aparecer antes ou simultâneo a replicação e acúmulo de DNA viral, que ocorre a partir de 6 h p.i..

A infecção das linhagens celulares não permissivas IPLB-LD652Y e C636 (Gráfico 3) demonstram falhas no programa de expressão gênica do AgMNPV. Nota-se um atraso na expressão a partir dos promotores *ie1* e *gp64*, que só induzem expressão de luciferase suficiente para detecção a partir de 5 h p.i., que em relação às células permissivas é um atraso de 3 h. A partir deste momento, o promotor *vp39* possui uma atividade muito baixa, que inicia após 6 h p.i. e é incapaz de gerar luminescência superior aos promotores *ie1* e *gp64* nestas infecções não permissivas, 100 vezes menor em comparação com os valores máximos induzidos nas infecções permissivas. Os demais promotores tardios *p6.9*, *polh* e *p10* tem uma atividade relativa ainda menor, até 1000 vezes menor em relação aos valores máximos das infecções permissivas. Em C636

o promotor polh é completamente inativo, mesmo após 120 h p.i. (dados não mostrados).

Este bloqueio da expressão dos promotores da fase tardia já foi reportado durante a infecção de AcMNPV recombinantes em diversas linhagens celulares derivadas de insetos. A infecção de AcMNPV em linhagens não permissivas como IPLB-LD652Y e BM-N (Morris & Miller, 1992) resulta em bloqueio da expressão do promotor polh e reduzida expressão do promotor vp39. A análise por citometria de fluxo da população de células semipermissivas IPRL-CF-1 and SES-MaBr-3, infectadas por AcMNPV recombinante, indica que apenas uma parcela da população é capaz de iniciar e completar a infecção. Por outro lado, a infecção de IPLB-SF21-AE resulta em 100% das células infectadas (Morris & Miller, 1993). Se este fenômeno ocorre durante as infecções dos AgMNPV recombinantes nas linhagens IPLB-LD652Y e C636, pode-se considerar que o atraso na expressão dos promotores virais está relacionado ao baixo número de células efetivamente com infecção iniciada, que irá resultar em uma luminescência inferior ao *background* até acumular suficiente luciferase nas células infectadas.

Um estudo diretamente relacionado com estes ensaios foi a análise da replicação e efeitos citopáticos do baculovírus AgMNPV em UFL-AG-286 e IPLB-SF21-AE realizada por Castro *et al.* (1997), que demonstra a capacidade de replicação do vírus nestas células, está de acordo com os resultados de atividade dos promotores, isto é, o AgMNPV é capaz de expressar todas classes de promotores nestas células. Em contrapartida, a infecção da linhagem IPRI-CF-124T (derivada de *Choristoneura fumiferana*) e BM5 resultam em infecções não produtivas, no caso de IPRI-CF-124T apenas 5% das células apresentam poliedros, e a produção de BVs é 100 vezes menor que em UFL-AG-286 (Castro *et al.*,1997). Análises de transcrição dos genes *ie1*,

dnapol, *gp67* e *polh* por *Northern blot* indicaram um bloqueio na expressão dos genes da fase tardia nas células não permissivas IPRI-CF-124T e BM5 (Castro, Souza & Bilimoria, 1999).

Os mecanismos precisos que induzem este bloqueio no programa de transcrição não são conhecidos, as atuais hipóteses cogitam a ausência de fatores de transcrição das células hospedeiras não permissivas, ou fatores presentes mas incapazes de interagir com as sequências dos promotores baculovirais. Em uma situação inversa, a sequência dos promotores de genes baculovirais pode não ser específica para os fatores de transcrição das células hospedeiras não permissivas, o que implica em uma pressão seletiva sobre as sequências dos promotores gênicos, no sentido de tornar-los mais eficientes para cada hospedeiro.

Não foi detectada luminescência nas infecções das células BM5, com qualquer um dos recombinantes. A análise do estado destas células por microscopia de luz revelou um grande número de células em apoptose e um grande número de corpos apoptóticos dispersos no meio de cultura (dados não mostrados). Isto está de acordo com observações anteriores em que BM5 não é capaz de replicar o AgMNPV e muitas células entram em apoptose (Castro *et al.*, 1997). Existe a possibilidade de ocorrer a transcrição do promotor *ie1*, pois a análise da transcrição do gene *ie1* durante as primeiras 10 h indicou um baixo nível de transcritos, os demais genes avaliados como *dnapol*, *polh* e *gp67* não apresentaram transcritos durante 50 h de infecção (Castro, Souza & Bilimoria, 1999). Nos experimentos realizados, nenhum promotor foi funcional, incluindo o promotor *ie1*. Com estes resultados, não é possível argumentar a favor de bloqueio transcricional de genes da fase precoce ou imediatamente precoce, como feito por Castro, Souza & Bilimoria (1999), pois não são evidências diretas que o vírus infectou as células e chegou ao núcleo, apenas evidências indiretas do efeito do

vírus sobre a célula (apoptose, efeitos citopáticos). Este resultado não é exclusivo à infecção de AgMNPV, o baculovírus AcMNPV também é incapaz de infectar esta célula produtivamente, e os efeitos citopáticos observados aqui foram muito similares aos comentados no trabalho de Mukherjee *et al.* (1995).

Este resultado é confuso, pois mesmo em uma linhagem não permissiva como C636, derivadas de um mosquito (Diptera) que é um inseto filogeneticamente distante da ordem Lepidoptera, diversos promotores do AgMNPV são funcionais. Enquanto que na linhagem BM5, derivada de uma larva da ordem Lepidoptera, nenhum promotor de AgMNPV é funcional. É possível que a partícula viral não seja capaz de entregar o DNA viral ao núcleo, devido à falta de interações entre capsídeo viral e proteínas transportadoras. Além disto, nas células que o DNA viral foi entregue ao núcleo, a expressão de proteínas virais pode induzir apoptose na célula, e os genes anti apoptóticos podem ser incapazes de neutralizar o mecanismo que leva a apoptose.

A expressão a partir do promotor gp64 é similar a do promotor ie1, ambos promotores iniciam a expressão nas primeiras 2 h p.i. e o acúmulo de luciferase segue padrões similares, em praticamente todas linhagens utilizadas. É possível afirmar que o promotor gp64 de AgMNPV tem um *timing* de expressão de gene imediatamente precoce, como o *ie1*. O promotor gp64 de OpMNPV, similar a do AgMNPV em relação a sequência que contém os elementos TATA e INR, tem uma atividade transcricional ampliada na presença da proteína IE1, indicando um evento de transativação (Blissard & Rohrmann, 1991), no entanto, sua rápida expressão indica que o início da atividade transcricional ocorre independente de transativação, esta atividade transcricional inicial utiliza a RNAPol II e fatores do hospedeiro para garantir expressão imediata após entrada do vírus na célula. Apenas na linhagem IPLB-SF21-AE ocorreu um atraso na expressão do promotor gp64, iniciando a expressão em 3 h p.i., enquanto que em UFL-

AG-286 e BTI-Tn-5B1-4 a expressão se inicia às 2 e 1 h p.i. respectivamente. É possível que em IPLB-SF21-AE, o promotor gp64 dependa da transativação por IE1 para intensificar sua expressão, daí o atraso apenas nesta linhagem celular.

Os promotores vp39 e p6.9 apresentaram um acúmulo surpreendente de luciferase. Estes dois promotores tem um potencial enorme na expressão de proteínas heterólogas, devido a rápida e intensa expressão, o que é muito desejável pois a expressão de proteínas em momentos muito tardios será afetada negativamente pelos efeitos citopáticos induzidos pela infecção, quando o ambiente celular está voltado para a formação de OBs, com redução no espaço citoplasmático, redução no volume do retículo endoplasmático e alterações nos mecanismos de síntese de proteínas e modificações pós-traducionais (Miller, 1997; Ishiyama & Ikeda, 2010).

O promotor vp39, previamente caracterizado como promotor de fase tardia (Morris & Miller, 1994), possui um perfil de expressão de gene precoce, precisamente, precoce atrasado (*delayed early*), com expressão entre 3 a 6 h p.i. nas linhagens suscetíveis. Este promotor já foi bem caracterizado para AcMNPV (Morris & Miller, 1994), e não existem motivos conhecidos de transcrição precoce CAGT na sequência do promotor, tanto em AcMNPV quanto em AgMNPV, desta forma os mecanismos envolvidos na expressão precoce deste promotor ainda são desconhecidos.

O promotor polh, considerado o promotor de escolha em ensaios de expressão de proteínas e classificado como muito tardio devido a hiperexpressão detectada após 24 h p.i. (Hasnain *et al.*, 2001), possui um perfil de expressão inicial similar ao promotor p6.9, iniciando a expressão a partir de 9 h p.i. em BTI-Tn-5B1-4, 12 h p.i. em UFL-AG-286 e em IPLB-SF21-AE após 13 h p.i.. Surpreendentemente, o promotor p6.9 induz uma expressão mais rápida, atingindo o valor máximo às 48 h p.i., enquanto que o

promotor *polh* só consegue atingir o mesmo valor após 80 h p.i.. No entanto, o promotor *polh* é capaz de gerar luminescências maiores quando em seu valor máximo.

O promotor p10, clonado no *locus* do gene *p10*, apresentou uma expressão muito fraca e tardia. O primeiro sinal de detecção ocorre após 15 h p.i. e o máximo de luminescência não passa de uma unidade relativa luminosa, ao longo de 120 h de medição. Isto está em desacordo com os estudos de transcrição do gene *p10* de AgMNPV, que identificaram transcritos após 18 h p.i. que aumentam drasticamente até 48 h p.i. (Razuck *et al.*, 2002). A atividade deste promotor não está clara, conforme a análise da sequência deste promotor, em AgMNPV ocorreu uma perda na sequência DAR ativadora em momentos muito tardios, a sequência *burst*, isto pode ter causado uma redução na expressão a partir deste promotor em comparação aos promotores p10 dos baculovírus próximos ao AcMNPV. É possível argumentar que o promotor p10 no *locus* da proteína p10 não será capaz de hipertranscrever em fases muito tardias devido à ausência de elementos *cis* contidos no *locus* *polh*, como os DAR. Ainda existe a possibilidade que o promotor p10 seja um promotor de fase muito tardia mas fraco, existe um relato que o promotor p10 de BmNPV não é tão forte quanto o promotor *polh* (Tomita *et al.*, 1995), como o promotor de p10 de AgMNPV e o de BmNPV são muito distintos não é possível estabelecer uma associação direta entre a atividade dos promotores p10 dos dois vírus.

Um segundo recombinante foi construído, contendo o promotor p10 no *locus* do gene *polh*, buscando compreender melhor a atividade deste promotor, no entanto este recombinante não pode ser confirmado e sua expressão não foi avaliada.

O promotor CMVie1 é funcional em todas células de inseto testadas, iniciando a expressão em conjunto com o promotor vp39, com um aumento de luminescência gradual, até atingir o pico de expressão em média às 15 h p.i., pelo menos 10 vezes

menor que os demais promotores baculovirais (exceto p10). Esta atividade em momentos precoces da infecção já foi reportada durante a transfecção de plasmídeos contendo o promotor mínimo CMVie1 (apenas os 200 pb a partir da extremidade 3') a montante do gene *luciferase*, em células IPLB-SF21-AE (Lo *et al.*, 2002).

Considerando a distância evolutiva entre os grupos *Herpesviridae* e *Baculoviridae*, é impressionante que este promotor de vírus de mamíferos seja funcional em células de inseto. Esta promiscuidade em utilização dos promotores pelas linhagens celulares cultivadas *in vitro* não é incomum, já que existem relatos de um promotor do baculovírus AcMNPV (etI) ativo em células derivadas de mamíferos (Liu, Chu & Wu, 2006), e relatos da atividade do promotor ie1 de AcMNPV também ativo em células de mamíferos (Liu *et al.*, 2009). Uma questão pendente é: onde precisamente se inicia a transcrição do promotor CMVie1 durante a infecção de células de inseto? A ausência de motivos de transcrição precoces ou tardios conhecidos na sequência deste promotor não quer dizer que ele não possua algum elemento transcricional críptico, funcional em células de inseto.

Um trabalho que tem direta relação ao realizado, foi a análise da expressão gênica do baculovírus AgMNPV infectando células UFL-AG-286 realizada por Oliveira (2006). Neste trabalho, foi avaliada a expressão de todos os genes de AgMNPV, sintetizando oligonucleotídeos específicos para cada um dos genes, e avaliando a concentração de mRNA ao longo da infecção por transcrição reversa seguida por PCR quantitativa (RT-qPCR). Os resultados do trabalho de Oliveira e os deste trabalho estão comparados de forma resumida na tabela 3. Espera-se que o mRNA seja detectado antes da proteína de cada gene, e isto foi constatado quando os dois resultados foram comparados. Os resultados de primeiro momento de detecção (T_{in}) estão bem alinhados entre os dois trabalhos. Os resultados de tempo até atingir máximo de detecção (T_{on}) já

divergem entre si, mas isto não é anormal, considerando que Oliveira só mediu até 48 h p.i., enquanto os ensaios deste trabalho foram além deste momento.

Tabela 3: Tabela resumo contendo informações dos elementos contidos (+) ou não (-) em cada promotor e a comparação entre os resultados de medição contínua de luminescência deste trabalho, que representa a medição da quantidade de enzima expressa, e os resultados obtidos pela análise de transcrição dos genes respectivos por qPCR, que representa a quantidade de mRNA produzido (Oliveira, 2006), durante a infecção de células UFL-AG-286 por AgMNPV. Tin: tempo de início da expressão, Tmax: tempo em que a expressão atinge o valor máximo e estabiliza

<i>Infecção de células UFL-Ag-286</i>				<i>Este trabalho (prot)</i>		<i>Oliveira, 2006 (mRNA)</i>	
Promotor	INR precoce	INR tardio	TATA box	Tin	Tmax	Tin	Tmax
ie1	+	-	+	2:00:00	17:00:00	0:00:00	9:00:00
gp64	+	+	+	3:00:00	17:00:00	3:00:00	48:00:00
vp39	-	+	+	6:00:00	48:00:00	3:00:00	9:00:00
p6.9	-	+	-	12:00:00	51:00:00	5:00:00	48:00:00
polh	-	+	-	12:00:00	80:00:00	5:00:00	48:00:00
p10	-	+	+	26:00:00	68:00:00	3:00:00	48:00:00

5.3. A infecção de larvas *Anticarsia gemmatalis* e *Spodoptera frugiperda*

A produção de proteínas recombinantes pelo sistema de expressão baculovírus depende do sistema eucariótico que será infectado pelo vetor baculoviral. Diversas metodologias são aplicáveis como a infecção de células de inseto suscetíveis e cultivadas em meio líquido, aderidas ou suspensas. No caso das células suspensas é possível utilizar biorreatores automatizados para infectar grandes volumes de células e assim obter alta concentração da proteína recombinante. A infecção de células de inseto aderidas, apesar de eficiente, não é tão produtiva quanto a infecção de células suspensas, pois a aderência ao fundo da placa limita o volume de células, uma vez formada a monocamada, as células sofrem inibição por contato e não realizam mitose. Além disto, o cultivo de células aderidas exige material plástico específico que possui um alto custo. Em ambos casos, expressão em biorreatores ou em células aderidas, o maior custo está na aquisição de meio de cultura para células de inseto e soro fetal bovino (Micheloud *et al.*, 2009, 2011).

Uma alternativa para a expressão a partir de baculovírus é utilizar as larvas hospedeiras como “biorreatores vivos”, isto é, infectar as larvas por via intrahemocélica e, depois de alguns dias, extrair as proteínas de interesse a partir do corpo das larvas infectadas (Manohar *et al.*, 2010). Esta alternativa é consideravelmente mais barata que o cultivo de células com o objetivo de expressar proteínas. Os níveis de produção de proteínas são altos utilizando o promotor polh para regular a expressão do gene de interesse, podendo compor mais que 25% do total de proteínas do corpo da larva ao fim do ensaio de expressão (Jha *et al.*, 1990).

Com o objetivo de avaliar e comparar a produtividade de proteínas recombinantes, larvas *Anticarsia gemmatalis* foram infectadas com os baculovírus recombinantes produzidos, por via intrahemocélica, e a produção de luminescência derivada da hemolinfa de larvas infectadas ao longo de 4 dias de infecção foi mensurada.

O perfil de expressão dos promotores durante infecção das larvas de inseto foi similar aos equivalentes em células permissivas cultivadas *in vitro*, isto é, os promotores vp39, p6.9 e polh induziram os maiores níveis de expressão (pelo menos 10 vezes maior que o nível máximo dos promotores precoces), enquanto que os promotores ie1 e gp64 induziram níveis inferiores. O promotor p10 induziu fraca luminescência ao longo de todo ensaio.

Diferente da expressão em células de inseto, em que o objetivo é uma rápida e intensa expressão de proteínas, idealmente utilizando promotores fortes da fase precoce como vp39, o melhor indutor na infecção de larvas é o promotor polh devido a produtividade consideravelmente maior, 10 vezes mais que o promotor p6.9 e 1000 vezes maior que o promotor ie1, a 122 h p.i..

Isto também foi claramente observado pelas fotografias em campo escuro das larvas infectadas e injetadas com o reagente luciferina. O vírus vAgPOLHFLUC induziu luminescência alta o suficiente para ser observada a olho nú.

O uso destes baculovírus AgMNPV recombinantes pode ir além do que medir a produtividade do sistema de expressão em larvas de inseto. Conforme demonstrado pela detecção de luminescência em pupa de *Anticarsia gemmatalis*, o gene luciferase serve como marcador de infecção dos recombinantes, fácil de ser detectado pelos métodos aqui utilizados. Um uso potencial destes recombinantes seria a avaliação da proliferação da infecção do baculovírus no campo ou em ambientes isolados e controlados. Outra possibilidade, e dando continuidade à este trabalho, seria a avaliação da capacidade de transmissão vertical do baculovírus AgMNPV.

A infecção das larvas *Spodoptera frugiperda* por via intrahemocélica tinha dois objetivos, avaliar a infectividade do baculovírus AgMNPV e produtividade dos promotores mais fortes, para determinar se é viável utilizar estas larvas como hospedeiros do sistema de expressão baculovírus baseado em AgMNPV. O perfil de expressão dos promotores em larvas *Spodoptera frugiperda* foi distinta da expressão em larvas *Anticarsia*. O nível máximo de expressão de todos promotores foi pelo menos 10 vezes menor, nos tempos equivalentes entre ensaios, sendo que o nível de expressão do promotor polh às 120 h p.i. foi 50 vezes menor que a expressão nas larvas *Anticarsia gemmatalis*. Este resultado já exclui as larvas *Spodoptera frugiperda* como “biorreatores vivos” usando como vetor o AgMNPV. Os promotores p6.9 e vp39 tiveram um perfil de expressão baixo, induzindo luminescência a níveis equivalentes ao promotor ie1.

O fenômeno mais peculiar deste ensaio é que a infecção apresentou um atraso de 24 h em relação ao ensaio com larvas *Anticarsia*. Os níveis de luminescência

consistentes só ocorreram a partir de 48 h p.i., com lento acúmulo de luminescência ao longo de 120 h de infecção. Isto indica uma possível restrição na infectividade do baculovírus AgMNPV sobre larvas *Spodoptera frugiperda*, e como a infecção foi iniciada na hemolinfa, é possível que a restrição ocorra a nível celular, isto é, o baculovírus AgMNPV não resulta em infecções muito produtivas nas células da hemolinfa ou tecidos em contato com esta. Como foi detectada uma expressão reduzida do promotor vp39 e p6.9, ambos regulam proteínas estruturais do capsídeo viral, existe a possibilidade que a redução na expressão destes genes, e conseqüente redução na produção de partículas virais, esteja diretamente relacionada a baixa infectividade do AgMNPV na hemolinfa de *Spodoptera frugiperda*, similar ao que já foi reportado para a infecção de AcMNPV em larvas *Anticarsia gemmatalis*, em que níveis baixos de expressão do gene *gp64* e uma quantidade reduzida de BVs produzidos foram identificados nas células de hemolinfa (Chikalya *et al.*, 2009).

5.4. O baculovírus AgMNPV é capaz de transduzir células derivadas de mamíferos

O uso de baculovírus para entrega gênica em células de mamíferos é uma metodologia bem estabelecida e utilizada para cumprir diversas funções, como a formação de linhagens celulares com expressão transiente ou estável de genes de interesse e a avaliação do efeito de determinada proteína sobre o metabolismo celular (Ghosh *et al.*, 2002). Os baculovírus servem como vetor de entrega gênica seguro em células de mamíferos devido a incapacidade de replicar e transcrever genes virais, isto é, os promotores baculovirais são inativos ou possuem baixa atividade transcricional nestas células. Já foi demonstrado que a transdução pelo baculovírus *Bombyx mori* NPV não altera o potencial transcricional da célula, mesmo ocorrendo uma transcrição fraca de genes baculovirais da fase precoce (Kenoutis *et al.*, 2006).

Como os promotores de baculovírus não possuem grande expressão em células de mamíferos, é necessário utilizar promotores nativos às linhagens celulares que serão transduzidas. O promotor CMVie1 é um destes promotores, com comprovada expressão em linhagens celulares e organismos variados (Blagborough *et al.*, 2010). A transdução só é possível graças à capacidade intrínseca da proteína GP64, contida no envelope dos BVs, de realizar a fusão das membranas da célula de mamífero e o envelope viral, permitindo a entrada do vírus na célula. O capsídeo então é capaz de utilizar o citoesqueleto e proteínas motoras para trafegar até o núcleo ou poro da membrana deste e ser desnudado. A transcrição ocorre imediatamente após a liberação do DNA viral no núcleo, utilizando os complexos de transcrição da célula de mamífero (van Loo *et al.*, 2001).

Como a maioria dos estudos referentes ao uso de baculovírus em células de mamíferos utilizam o baculovírus tipo AcMNPV, pouco se sabe sobre a capacidade dos demais baculovírus, como o AgMNPV, de entrarem e transduzirem células de mamíferos. Para verificar esta capacidade do AgMNPV, foi construído um baculovírus recombinante contendo o promotor CMVie1 a montante do gene *luciferase*, e duas linhagens celulares derivadas de carcinomas humanos foram transduzidas, MCF-7, derivada de tumor da mama, e DU145, derivada de tumor da próstata.

Conforme observado no gráfico 6, os BVs do vírus vAgCMVFLUC, produzidos em células de inseto, são capazes de transduzir células de mamíferos cultivadas *in vitro*. A expressão ocorre apenas nas primeiras 12 h de transdução, após isto só é possível detectar sinais de luminescência muito fracos, limítrofes se considerarmos o limite de corte estabelecido para os demais experimentos, 0,050 RLU. Esta expressão transiente já foi reportada para o baculovírus AcMNPV, a hipótese que explica este fenômeno é que durante a divisão celular, quando ocorre a cariocinese e separação das cromátides

irmãs, o DNA do baculovírus não é particionado junto aos cromossomos e termina deslocado para o citoplasma de uma das células filhas, onde é degradado.

A multiplicidade de infecção (MOI) teve um impacto considerável, em MOI 10 a transdução à 6 h p.t. foi fraca em ambas linhagens, em contrapartida, a transdução em MOI 30 induziu os maiores níveis de luminescência na linhagem MCF-7. A transdução de células de mamíferos normalmente é feita com MOI acima de 100 (van Loo *et al.*, 2001). A transdução ótima de células derivadas de rim HEK293, por baculovírus BmNPV recombinante contendo gene repórter, estimou a condição ótima de transdução em MOI 500 e com a adição de um inibidor de deacetilase de histonas TSA (Kenoutis *et al.*, 2006). Ensaio futuros poderão determinar qual a condição ótima de transdução de células de mamíferos pelo baculovírus vAgCMVFLUC.

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Os baculovírus recombinantes construídos são poderosas ferramentas nos estudos da biologia do baculovírus AgMNPV. Como as diferentes classes de promotores isolados dependem de fatores de transcrição do hospedeiro e proteínas funcionais do vírus, é possível avaliar diferentes aspectos da infectividade do AgMNPV em diferentes linhagens celulares e insetos. Estes baculovírus recombinantes de fácil detecção poderão ser utilizados para estudar a dispersão dos baculovírus em ambientes artificiais (como gaiolas de cultivo de larvas *Anticarsia gemmatalis*), avaliando a transmissão vertical e horizontal, e possivelmente a aplicação no campo.

A nova técnica de medição contínua de luminescência é uma forma alternativa de aquisição de informações biológicas sobre a infectividade dos baculovírus, a atividade dos promotores e a otimização de sistemas de expressão baseados em baculovírus como vetores.

Os resultados obtidos com a infecção de células de inseto cultivadas *in vitro* mostram uma deficiência na transcrição de genes da fase tardia da infecção, em células não permissivas, que está de acordo com as evidências de experimentos similares utilizando o próprio AgMNPV e demais baculovírus. Resumidamente: as linhagens UFL-AG-286, IPLB-SF21-AE e BTI-Tn5B1-4 foram capazes de ativar todas as classes de promotores, em uma sequência idêntica de ativação. Nas linhagens C636 e LD652Y, o que foi encontrado é um programa transcricional abortado, com deficiência na expressão de genes da fase tardia. As evidências apontam para um bloqueio a nível transcricional, mas não foram suficientes para especificar a causa ou mecanismo deste bloqueio. A geração de novos recombinantes contendo genes que ampliam o espectro de

hospedeiros ou genes de outros baculovírus podem elucidar os elementos responsáveis pelas características de infectividade do baculovírus AgMNPV.

Com base nos resultados deste ensaio, foi possível tirar algumas conclusões relativas à expressão de proteínas heterólogas em células de inseto utilizando o baculovírus AgMNPV como vetor de expressão. Em primeiro lugar, o promotor polh pode não ser o melhor promotor para expressão de proteínas no sistema de expressão baculovírus que utiliza células de inseto cultivadas *in vitro*, o simples fato de induzir uma grande produção não é característica suficiente ou única a este promotor. Os promotores vp39 e p6.9 atingem o pico de expressão entre 40 e 60 h p.i., enquanto o promotor polh atinge o pico após 80 h p.i.. Para expressar proteínas transmembrânicas, o promotor vp39 é o promotor de escolha, em momentos precoces da infecção o retículo endoplasmático da célula ainda não foi afetado e assim permite a síntese adequada de proteínas transmembrânicas. Para expressar proteínas solúveis em grande quantidade, pode-se optar entre promotor polh ou p6.9, entre os dois, o promotor p6.9 possivelmente é uma melhor opção pois este atinge o pico de expressão a 50 h p.i., enquanto o promotor polh só atinge o pico após 80 h p.i..

Os resultados deste trabalho podem ser diretamente aplicados à expressão de proteínas em células e larvas de inseto. A maior aplicação está na otimização da produtividade do sistema, isto é, foram avaliadas as atividades de dois promotores fortes, nunca estudados anteriormente, p6.9 e vp39, que podem ser tão produtivos quanto o promotor comumente utilizado, polh. Além disto, foi demonstrado que a expressão de proteínas recombinantes em larvas é viável e bastante eficiente. Isto tudo significa um número maior de opções no *design* dos vetores de expressão baseado no baculovírus AgMNPV.

Esta foi a primeira vez que foi comprovada a transdução de células de mamíferos cultivadas *in vitro* pelo baculovírus AgMNPV, o que poderá ampliar as aplicações de uso deste baculovírus para o campo de vetores de *delivery* gênico ou terapia gênica em mamíferos, que é uma área em grande desenvolvimento atual.

Devido ao acúmulo de genomas de baculovírus nas databases internacionais, novas abordagens na comparação da variabilidade entre genomas e a maior capacidade computacional das novas tecnologias eletrônicas, é possível realizar estudos inéditos sobre as sequências dos promotores, o que permitirá a elucidação mais precisa dos mecanismos moleculares de transcrição dos baculovírus, um tema atualmente pouco estudado. Neste trabalho, a literatura referente ao tema foi revisada e os elementos transcricionais dos promotores selecionados do baculovírus AgMNPV foram anotados, o que gera um importante ponto de partida para que um dia seja possível atingir a completa integração das informações biológicas experimentais e as adquiridas por métodos de bioinformática.

Este trabalho demonstrou diversos aspectos do grande potencial biotecnológico do baculovírus AgMNPV e levantou novas questões de estudo sobre as características dos promotores virais, é muito importante que ocorram estímulos à produção de conhecimento na biologia deste vírus, à utilização para fins de controle biológico, expressão de proteínas e estudos ecológicos dos vírus de insetos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOT, A. R. *et al.* Development of Resistance by *Anticarsia gemmatalis* from Brazil and the United States to a Nuclear Polyhedrosis Virus under Laboratory Selection Pressure. *Biological Control*, v. 7, n. 1, p. 126-130, ago. 1996
- ALLARD, S. T. M.; KOPISH, K.; Luciferase reporter assays: powerful, adaptable tools for cell biology research. *Cell Notes*, Issue 21, Promega Corporation, 2008
- BLAGBOROUGH, A. M. *et al.* Intranasal and intramuscular immunization with Baculovirus Dual Expression System-based Pvs25 vaccine substantially blocks *Plasmodium vivax* transmission. *Vaccine*, v. 28, n. 37, p. 6014-20, ago. 2010
- BLISSARD, G. W.; ROHRMANN, G. F. Baculovirus *gp64* gene expression: analysis of sequences modulating early transcription and transactivation by IE1. *Journal of Virology*, v. 65, n. 11, p. 5820-7, nov. 1991
- BORODINA, T. A.; LEHRACH, H.; SOLDATOV, A. V. DNA purification on homemade silica spin-columns. *Analytical Biochemistry*, v. 321, n. 1, p. 135-7, out. 2003
- CASTRO, M. E. *et al.* Replication of *Anticarsia gemmatalis* nuclear polyhedrosis virus in four lepidopteran cell lines. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 69, n. 1, p. 40-5, jan. 1997
- CASTRO, M. E.; SOUZA, M. L.; BILIMORIA, S. L. Host-specific transcription of nucleopolyhedrovirus gene homologues in productive and abortive *Anticarsia gemmatalis* MNPV infections. *Archives of Virology*, v. 144, n. 6, p. 1111-21, jan. 1999
- CASTRO, M. E.; RIBEIRO, B. M. Production of viral progeny in insect cells undergoing apoptosis induced by a mutant *Anticarsia gemmatalis* nucleopolyhedrovirus. *Microbiological Research*, 369-76, 2001
- CHANG, M. J.; BLISSARD, G. W. Baculovirus *gp64* gene expression: negative regulation by a minicistron. *Journal of Virology*, v. 71, n. 10, p. 7448-60, out. 1997
- CHIKHALYA, A. *et al.* Pathogenesis of *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus in fifth-instar *Anticarsia gemmatalis* larvae. *Journal of General Virology*, v. 90, n. 8, p. 2023-32, ago. 2009
- CLEM, R. J. Baculoviruses and apoptosis: a diversity of genes and responses. *Current Drug Targets*, v. 8, n. 10, p. 1069-74, out. 2007
- CONDREAY, J. P. *et al.* Transient and stable gene expression in mammalian cells transduced with a recombinant baculovirus vector. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 96, n. 1, p. 127-32, jan. 1999
- CORDEIRO, B. A. *et al.* Structural and ultrastructural alterations of Malpighian tubules of *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae infected with different *Anticarsia gemmatalis* multiple nucleopolyhedrovirus (AgMNPV) recombinant viruses. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 98, n. 1, p. 7-19, maio 2008
- COULIBALY, F. *et al.* The atomic structure of baculovirus polyhedra reveals the independent emergence of infectious crystals in DNA and RNA viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 106, n. 52, p. 22205-10, dez. 2009
- DANQUAH, J. O. *et al.* Direct interaction of baculovirus capsid proteins VP39 and EXON0 with kinesin-1 in insect cells determined by fluorescence resonance energy transfer-fluorescence lifetime imaging microscopy. *Journal of Virology*, v. 86, n. 2, p. 844-53, jan. 2012

- DE JONG, J. G. *et al.* Analysis of the *Choristoneura fumiferana* nucleopolyhedrovirus genome. *Journal of General Virology*, v. 86, n. 4, p. 929-43, abr. 2005
- DE LIMA, L. *et al.* Identification, expression and phylogenetic analysis of the *Anticarsia gemmatalis* multicapsid nucleopolyhedrovirus (AgMNPV) *Helicase* gene. *Virus Genes*, v. 29, n. 3, p. 345-52, dez. 2004
- FICKENSCHER, H. *et al.* The role of a repetitive palindromic sequence element in the human cytomegalovirus major immediate early enhancer. *Journal of General Virology*, v. 70, p. 107-23, jan. 1989
- FUXA, J.; RICHTER, A. Repeated reversion of resistance to nucleopolyhedrovirus by *Anticarsia gemmatalis*. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 71, n. 2, p. 159-64, mar. 1998
- GHOSH, S. *et al.* The host factor polyhedrin promoter binding protein (PPBP) is involved in transcription from the baculovirus polyhedrin gene promoter. *Journal of Virology*, v. 72, n. 9, p. 7484-93, set. 1998
- GHOSH, S. *et al.* Baculovirus as mammalian cell expression vector for gene therapy: an emerging strategy. *Molecular therapy: the Journal of the American Society of Gene Therapy*, v. 6, n. 1, p. 5-11, jul. 2002
- GLOCKER, B.; HOOPEES, R. R.; ROHRMANN, G. F. *In vitro* transactivation of baculovirus early genes by nuclear extracts from *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus-infected *Spodoptera frugiperda* cells. *Journal of Virology*, v. 66, n. 6, p. 3476-84, jun. 1992
- GLOCKER, B. *et al.* *In vitro* transcription from baculovirus late gene promoters: accurate mRNA initiation by nuclear extracts prepared from infected *Spodoptera frugiperda* cells. *Journal of Virology*, v. 67, n. 7, p. 3771-6, jul. 1993
- GOODWIN, R. H.; TOMPKINS, G. J.; MCCAWLEY, P. Gypsy moth cell lines divergent in viral susceptibility. I. Culture and identification. *In vitro*, v. 14, n. 6, p. 485-94, jun. 1978
- GRACE, T. D. Establishment of four strains of cells from insect tissues grown *in vitro*. *Nature*, v. 195, p. 788-9, ago. 1962
- GRANADOS, R. R. *et al.* A new insect cell line from *Trichoplusia ni* (BTI-Tn-5B1-4) susceptible to *Trichoplusia ni* single enveloped nuclear polyhedrosis virus. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 64, n. 3, p. 260-266, nov. 1994
- GROSS, C. H.; RUSSELL, R. L.; ROHRMANN, G. F. *Orgyia pseudotsugata* baculovirus p10 and polyhedron envelope protein genes: analysis of their relative expression levels and role in polyhedron structure. *Journal of General Virology*, v. 75, p. 1115-23, maio 1994
- GUARINO, L. A. *et al.* A virus-encoded RNA polymerase purified from baculovirus-infected cells. *Journal of Virology*, v. 72, n. 10, p. 7985-91, out. 1998
- HAAS-STAPLETON, E. J.; WASHBURN, J. O.; VOLKMAN, L. E. *Spodoptera frugiperda* resistance to oral infection by *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus linked to aberrant occlusion-derived virus binding in the midgut. *Journal of General Virology*, v. 86, n. 5, p. 1349-55, maio 2005
- HERNIOU, E. A. *et al.* Ancient coevolution of baculoviruses and their insect hosts. *Journal of Virology*, v. 78, n. 7, p. 3244-51, abr. 2004
- HOOPEES, R. R.; ROHRMANN, G. F. *In vitro* transcription of baculovirus immediate early genes: accurate mRNA initiation by nuclear extracts from both insect and human cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 88, n. 10, p. 4513-7, 15 maio 1991

- IGARASHI, A. Isolation of a Singh's *Aedes albopictus* cell clone sensitive to Dengue and Chikungunya viruses. *The Journal of General Virology*, v. 40, n. 3, p. 531-44, set. 1978
- ISHIYAMA, S.; IKEDA, M. High-level expression and improved folding of proteins by using the vp39 late promoter enhanced with homologous DNA regions. *Biotechnology Letters*, v. 32, n. 11, p. 1637-47, nov. 2010
- JARVIS, D. L.; WEINKAUF, C.; GUARINO, L. A. Immediate-early baculovirus vectors for foreign gene expression in transformed or infected insect cells. *Protein Expression and Purification*, v. 8, n. 2, p. 191-203, set. 1996
- JEHLE, J. A. *et al.* On the classification and nomenclature of baculoviruses: a proposal for revision. *Archives of Virology*, v. 151, n. 7, p. 1257-66, jul. 2006
- JHA, P. K. *et al.* Firefly luciferase, synthesized to very high levels in caterpillars infected with a recombinant baculovirus, can also be used as an efficient reporter enzyme *in vivo*. *FEBS Letters*, v. 274, n. 1-2, p. 23-6, nov. 1990
- JIANG, S. S. *et al.* Temporal transcription program of recombinant *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrosis virus. *Journal of Virology*, v. 80, n. 18, p. 8989-99, set. 2006
- KATO, T. *et al.* Improvement of the transcriptional strength of baculovirus multo tardia polyhedrin promoter by repeating its untranslated leader sequences and coexpression with the primary transactivator. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 113, n. 6, p. 694-6, jun. 2012
- KATSUMA, S. *et al.* Mass identification of transcriptional units expressed from the *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus genome. *Journal of General Virology*, v. 92, n. Pt 1, p. 200-3, jan. 2011
- KENOUTIS, C. *et al.* Baculovirus-mediated gene delivery into mammalian cells does not alter their transcriptional and differentiating potential but is accompanied by early viral gene expression. *Journal of Virology*, v. 80, n. 8, p. 4135-46, abr. 2006
- KIM, N. Y. *et al.* Short-hairpin RNA-mediated gene expression interference in *Trichoplusia ni* cells. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 22, n. 2, p. 190-8, fev. 2012
- KOGAN, P. H.; CHEN, X.; BLISSARD, G. W. Overlapping TATA-dependent and TATA-independent early promoter activities in the baculovirus gp64 envelope fusion protein gene. *Journal of Virology*, v. 69, n. 3, p. 1452-61, mar. 1995
- KOJIMA, K. *et al.* Tandem repetition of baculovirus iel promoter results in upregulation of transcription. *Archives of Virology*, v. 146, n. 7, p. 1407-14, jul. 2001
- KOST, T. A.; CONDREAY, J. P. Recombinant baculoviruses as expression vectors for insect and mammalian cells. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 10, n. 5, p. 428-33, out. 1999
- KOVACS, G. R. *et al.* Identification of spliced baculovirus RNAs expressed late in infection. *Virology*, v. 185, n. 2, p. 633-43, dez. 1991
- LAUZON, H. A. M. *et al.* Gene organization and sequencing of the *Choristoneura fumiferana* defective nucleopolyhedrovirus genome. *Journal of General Virology*, v. 86, n. 4, p. 945-61, abr. 2005
- LEISY, D.; ROHRMANN, G.; BEAUDREAU, G. The nucleotide sequence of the polyhedrin gene region from the multicapsid baculovirus of *Orgyia pseudotsugata*. *Virology*, v. 153, n. 2, p. 280-8, set. 1986
- LEVY, S. M. *et al.* A morphometric study of the midgut in resistant and non-resistant *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae to its nucleopolyhedrovirus (AgMNPV). *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 101, n. 1, p. 17-22, abr. 2009

- LIU, C. Y. *et al.* RING and coiled-coil domains of baculovirus IE2 are critical in strong activation of the cytomegalovirus major immediate-early promoter in mammalian cells. *Journal of Virology*, v. 83, n. 8, p. 3604-16, abr. 2009
- LIU, G.; CARSTENS, E. B. Site-directed mutagenesis of the AcMNPV *p143* gene: effects on baculovirus DNA replication. *Virology*, v. 253, n. 1, p. 125-36, jan. 1999
- LIU, Y.; CHU, C.; WU, T. Baculovirus ETL promoter acts as a shuttle promoter between insect cells and mammalian cells. *Acta Pharmacologica Sinica*, v. 27, n. 3, p. 321-7, mar. 2006
- LO, H. R. *et al.* Novel baculovirus DNA elements strongly stimulate activities of exogenous and endogenous promoters. *Journal of Biological Chemistry*, v. 277, n. 7, p. 5256-64, 15 fev. 2002
- LU, A.; CARSTENS, E. B. Nucleotide sequence of a gene essential for viral DNA replication in the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Virology*, v. 181, n. 1, p. 336-47, mar. 1991
- MANOHAR, S. L. *et al.* Enhanced gene expression in insect cells and silkworm larva by modified polyhedrin promoter using repeated burst sequence and multio transcrip-tional factor-1. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 107, n. 6, p. 909-16, 15 dez. 2010
- MARKIEWICZ, M. *et al.* The 72-kilodalton IE-1 protein of human cytomegalovirus (HCMV) is a potent inducer of connective tissue growth factor (CTGF) in human dermal fibroblasts. *Clinical and Experimental Rheumatology*, v. 22, n. 3 Suppl 33, p. S31-4, 2004
- MEIER, J. L.; PRUESSNER, J. A. The human cytomegalovirus major immediate-early distal enhancer region is required for efficient viral replication and immediate-early gene expression. *Journal of Virology*, v. 74, n. 4, p. 1602-13, fev. 2000
- MICHELOUD, G. A. *et al.* Production of occlusion bodies of *Anticarsia gemmatalis* multiple nucleopolyhedrovirus in serum-free suspension cultures of the saUFL-AG-286 cell line: influence of infection conditions and statistical optimization. *Journal of Virological Methods*, v. 162, n. 1-2, p. 258-66, dez. 2009
- MILLER, L. *The Baculoviruses*, Springer, 1997. p. 468
- MILLER, L. K. Baculoviruses: high-level expression in insect cells. *Current Opinion in Genetics & Development*, v. 3, n. 1, p. 97-101, fev. 1993
- MORRIS, T. D.; MILLER, L. K. Characterization of productive and non-productive AcMNPV infection in selected insect cell lines. *Virology*, v. 197, n. 1, p. 339-48, nov. 1993
- MORRIS, T. D.; MILLER, L. K. Mutational analysis of a baculovirus major late promoter. *Gene*, v. 140, n. 2, p. 147-53, mar. 1994
- MORRIS, T. D.; MILLER, L. K. Promoter influence on baculovirus-mediated gene expression in permissive and nonpermissive insect cell lines. *Journal of Virology*, v. 66, n. 12, p. 7397-405, dez. 1992
- MOSCARDI, F. Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera. *Annual Review of Entomology*, v. 44, p. 257-89, jan. 1999
- MUKHERJEE, B. *et al.* Transcriptional regulation of cell line-dependent, baculovirus-mediated expression of foreign genes. *DNA and Cell Biology*, v. 14, n. 1, p. 7-14, jan. 1995
- MURHAMMER, D. W.; *Baculovirus and Insect Cell Expression Protocols (Methods in Molecular Biology)*. [1. ed]: Humana Press, 2007
- NAGAMINE, T. *et al.* Focal distribution of baculovirus IE1 triggered by its binding to the hr DNA elements. *Journal of Virology*, v. 79, n. 1, p. 39-46, jan. 2005

- NEVES, S. G.; MACHADO, A. A.; FREITAS, D. S.; PINEDO, F. J. R. ; WOLFF, J. L. C.; RIBEIRO, B. M.. Activity of the *Firefly Luciferase* gene under the control of baculovirus early (*helicase*) and muito tardia (*p10*) promoters in insect cells. In: XVI National Meeting of Virology, 2005, Salvador. *Virus Reviews & Research*. Rio de Janeiro: Brazilian Society for Virology, v. 10. p. 81-81, 2005
- OHRESSER, M. *et al.* Sequence analysis and transcriptional mapping of the orf-2 gene of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Gene*, v. 152, n. 2, p. 201-4, jan. 1995
- OLIVEIRA, J. V. C. *et al.* Genome of the most widely used viral biopesticide: *Anticarsia gemmatalis* multiple nucleopolyhedrovirus. *Journal of General Virology*, v. 87, n. 11, p. 3233-50, nov. 2006
- OLIVEIRA, J. V. C. Expressão temporal dos genes do nucleopoliedrovírus *Anticarsia gemmatalis* e sua influência sobre a célula. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Biotecnologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.
- PASSARELLI, A. L. Barriers to success: how baculoviruses establish efficient systemic infections. *Virology*, v. 411, n. 2, p. 383-92, mar. 2011
- PENG, Y. *et al.* The protamine-like DNA-binding protein P6.9 epigenetically up-regulates *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus gene transcription in the late infection phase. *Virologica Sinica*, v. 27, n. 1, p. 57-68, fev. 2012
- PINEDO, F. J. R.; Estudo de promotores de genes do baculovírus de *Anticarsia gemmatalis* durante a infecção de células de inseto e análise do recombinante vAgEGT(delta)-lacZ. Tese (doutorado) - Universidade de Brasília, Instituto de Ciências Biológicas, Brasília. 2004.
- POMBO, V. *et al.* Structural and ultrastructural changes during the infection of UFL-AG-286 cells with the baculovirus AgMNPV. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 72, n. 3, p. 239-45, nov. 1998
- PULLEN, S. S.; FRIESEN, P. D. Early transcription of the *ie-1* transregulator gene of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus is regulated by DNA sequences within its 5' noncoding leader region. *Journal of Virology*, v. 69, n. 1, p. 156-65, jan. 1995a
- PULLEN, S. S.; FRIESEN, P. D. The CAGT motif functions as an initiator element during early transcription of the baculovirus transregulator *ie-1*. *Journal of Virology*, v. 69, n. 6, p. 3575-83, jun. 1995b
- RAMACHANDRAN, A. *et al.* Novel Sp family-like transcription factors are present in adult insect cells and are involved in transcription from the polyhedrin gene initiator promoter. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 276, n. 26, p. 23440-9, jun. 2001
- RANKIN, C.; OOI, B. G.; MILLER, L. K. Eight base pairs encompassing the transcriptional start point are the major determinant for baculovirus *polyhedrin* gene expression. *Gene*, v. 70, n. 1, p. 39-49, out. 1988
- RAZUCK, F. B. *et al.* Characterization of the *p10* gene region of *Anticarsia gemmatalis* nucleopolyhedrovirus. *Virus Genes*, v. 24, n. 3, p. 243-7, jun. 2002
- REED, L. J.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *American Journal of Epidemiology*, v. 27, n. 3, p. 493-497, maio 1938
- RIBEIRO, B. M. *et al.* Construction of a recombinant *Anticarsia gemmatalis* nucleopolyhedrovirus (AgMNPV-2D) harbouring the beta-galactosidase gene. *Archives of Virology*, v. 146, n. 7, p. 1355-67, jul. 2001
- RIBEIRO, B. M.; HUTCHINSON, K.; MILLER, L. K. A mutant baculovirus with a temperature-sensitive IE-1 transregulatory protein. *Journal of Virology*, v. 68, n. 2, p. 1075-84, fev. 1994

- RODAS, V. M. *et al.* Cell culture derived AgMNPV bioinsecticide: biological constraints and bioprocess issues. *Cytotechnology*, v. 48, n. 1-3, p. 27-39, jun. 2005
- ROHRMANN, G.F.; *Baculovirus Molecular Biology*. [2.ed]: National Center for Biotechnology Information (US). 2011
- ROYCHOUDHURY, A.; BASU, S.; SENGUPTA, D. N. Analysis of comparative efficiencies of different transformation methods of *E. coli* using two common plasmid vectors. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*, v. 46, n. 5, p. 395-400, out. 2009
- SALEM, T. Z. *et al.* Comprehensive analysis of host gene expression in *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus-infected *Spodoptera frugiperda* cells. *Virology*, v. 412, n. 1, p. 167-78, mar. 2011
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. *Molecular Cloning - Sambrook & Russel - Vol. 1, 2, 3*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001
- SIEBURTH, P. J.; MARUNIAK, J. E. Growth characteristics of a continuous cell line from the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae). *In vitro Cellular & Developmental Biology*, v. 24, n. 3, p. 195-198, mar. 1988
- SLACK, J. M.; ARIF, B. M. The baculoviruses occlusion-derived virus: virion structure and function. *Advances in Virus Research*, v. 69, p. 99-165, jan. 2007
- SLACK, J. M.; RIBEIRO, B. M.; DE SOUZA, M. L. The *gp64* locus of *Anticarsia gemmatalis* multicapsid nucleopolyhedrovirus contains a 3' repair exonuclease homologue and lacks *v-cath* and *ChiA* genes. *Journal of General Virology*, v. 85, n. 1, p. 211-9, jan. 2004
- SOARES, J. S.; RIBEIRO, B. M. Pathology of *Anticarsia gemmatalis* larvae infected by two recombinant *A. gemmatalis* multicapsid nucleopolyhedroviruses. *Research in Microbiology*, v. 156, n. 2, p. 263-9, mar. 2005
- THEILMANN, D. A.; STEWART, S. Identification and characterization of the IE-1 gene of *Orgyia pseudotsugata* multicapsid nuclear polyhedrosis virus. *Virology*, v. 180, n. 2, p. 492-508, fev. 1991
- THIEM, S. M.; MILLER, L. K. Differential gene expression mediated by late, very late and hybrid baculovirus promoters. *Gene*, v. 91, n. 1, p. 87-94, 2 jul. 1990
- TODD, J. W. *et al.* Factors regulating baculovirus late and very late gene expression in transient-expression assays. *Journal of Virology*, v. 70, n. 4, p. 2307-17, abr. 1996
- TODD, J. W.; PASSARELLI, A. L.; MILLER, L. K. Eighteen baculovirus genes, including *lef-11*, *p35*, *39K*, and *p47*, support late gene expression. *Journal of Virology*, v. 69, n. 2, p. 968-74, fev. 1995
- TOMITA, S. *et al.* Isolation of *p10* gene from *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus and study of its promoter activity in recombinant baculovirus vector system. *Cytotechnology*, v. 17, n. 2, p. 65-70, jan. 1995
- TWEETEN, K. A.; BULLA, L. A.; CONSIGLI, R. A. Characterization of an extremely basic protein derived from granulosis virus nucleocapsids. *Journal of Virology*, v. 33, n. 2, p. 866-76, fev. 1980
- VAN LOO, N. D. *et al.* Baculovirus infection of nondividing mammalian cells: mechanisms of entry and nuclear transport of capsids. *Journal of Virology*, v. 75, n. 2, p. 961-70, jan. 2001
- VAN OERS, M. M. *et al.* Secretory pathway limits the enhanced expression of classical swine fever virus E2 glycoprotein in insect cells. *Journal of Biotechnology*, v. 86, n. 1, p. 31-8, 9 mar. 2001
- VAUGHN, J. L. *et al.* The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera; Noctuidae). *In vitro*, v. 13, n. 4, p. 213-7, abr. 1977

- WASHBURN, J. O. *et al.* Early synthesis of budded virus envelope fusion protein GP64 enhances *Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus virulence in orally infected *Heliothis virescens*. *Journal of Virology*, v. 77, n. 1, p. 280-90, jan. 2003
- WEYER, U.; POSSEE, R. D. Analysis of the promoter of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus *p10* gene. *Journal of General Virology*, v. 70 (Pt 1), p. 203-8, jan. 1989
- WICKHAM, T. J. *et al.* Screening of insect cell lines for the production of recombinant proteins and infectious virus in the baculovirus expression system. *Biotechnology Progress*, v. 8, n. 5, p. 391-6, 1992
- WILSON, M. E. *et al.* Location, transcription, and sequence of a baculovirus gene encoding a small arginine-rich polypeptide. *Journal of Virology*, v. 61, n. 3, p. 661-6, mar. 1987
- WILSON, M. E.; CONSIGLI, R. A. Functions of a protein kinase activity associated with purified capsids of the granulosis virus infecting *Plodia interpunctella*. *Virology*, v. 143, n. 2, p. 526-35, jun. 1985
- WILSON, M. E.; PRICE, K. H. Association of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (AcMNPV) with the nuclear matrix. *Virology*, v. 167, n. 1, p. 233-41, nov. 1988
- WU, T. Y. *et al.* Expression of highly controllable genes in insect cells using a modified tetracycline-regulated gene expression system. *Journal of Biotechnology*, v. 80, n. 1, p. 75-83, 9 jun. 2000
- YANG, S.; MILLER, L. K. Activation of baculovirus *muito tardia* promoters by interaction with *muito tardia* factor 1. *Journal of Virology*, v. 73, n. 4, p. 3404-9, abr. 1999
- YU, W. *et al.* The screening and functional study of proteins binding with the BmNPV polyhedrin promoter. *Virology Journal*, v. 9, p. 90, jan. 2012
- ZANOTTO, P. M. *et al.* The *Anticarsia gemmatalis* nuclear polyhedrosis virus polyhedrin gene region: sequence analysis, gene product and structural comparisons. *Journal of General Virology*, v. 73 (Pt 5), p. 1049-56, maio 1992
- ZANOTTO, P. M.; KESSING, B. D.; MARUNIAK, J. E. Phylogenetic interrelationships among baculoviruses: evolutionary rates and host associations. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 62, n. 2, p. 147-164, 1993
- ZHANG, Y. *et al.* Spread of recombinant *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus in various tissues of silkworm *Bombyx mori* determined by real-time PCR. *Analytical Biochemistry*, v. 373, n. 1, p. 147-53, fev. 2008